

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)

**Funktion des Adenovirus Serotyp 12 E1A-Gens
bei der malignen Transformation primärer Mauszellen**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Essen

vorgelegt von
Oliver Lehmkuhler
aus Dinslaken

Februar 2002

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche
2. Gutachter: Prof. Dr. W. U. Müller

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dr. Ch. Redies

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2002

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	V
1	Einleitung	1
1.1	Adenoviren	1
1.1.1	Die produktive Infektion	3
1.1.2	Die abortive Infektion	4
1.2	Die Struktur der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2	6
1.2.1	Die Funktionen der Proteine Ad-E1A _{13S} und Ad-E1A _{12S}	8
1.2.2	Transformation durch Adenoviren	10
1.2.3	Die Onkogenität der E1A-Region von Ad12	12
1.2.4	Die Rolle der Proteine Ad12-E1A _{10S/11S} und Ad12-E1A _{9,5S} bei der onkogenen Transformation	14
1.3	Ziel der Arbeit	16
2	Material	18
2.1	Chemikalien	18
2.2	Enzyme	19
2.3	Oligonukleotide	20
2.4	Plasmide	20
2.5	Antikörper	21
2.6	Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur	21
2.7	Radiochemikalien	22
2.8	Molekulargewichtstandards	22
2.9	Kits und spezielle Reagenzien	23
2.10	Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien	24
2.11	Spezielle Laborgeräte	24
2.12	Puffer und Lösungen	25
2.13	Bakterienstämme	28
2.14	Zelllinien	28

3	Methoden	29
3.1	Allgemeine Methoden	29
3.2	Zellkultur	29
3.2.1	Präparation primärer Mausnierenzellen	30
3.2.2	Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren	30
3.2.3	Transfektion von Eukaryontenzellen durch Lipofektion	30
3.2.4	Herstellung stabiler Zelllinien	31
3.2.5	Kultivierung von Zellen in Weichagar (Lindl und Bauer, 1994)	31
3.3	Tierversuche	32
3.3.1	Haltungsbedingungen	32
3.3.2	Tumorinduktionsversuche	32
3.3.3	Rekultivierung von Tumorzellen	33
3.4	Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren	33
3.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis <i>et al.</i> , 1986)	33
3.4.2	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	33
3.4.3	Southern-Blotting (Southern, 1975)	34
3.4.4	Hybridisierung von DNA	34
3.5	Analyse von Proteinen	35
3.5.1	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen	35
3.5.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Tumorgewebe	35
3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.5.4	Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)	36
3.5.5	Bestimmung der Halbwertszeit zellulärer Proteine durch Pulse-Chase-Untersuchungen	37
3.5.6	Immunpräzipitation	37
3.5.7	FACS-Analysen	38
3.6	Histologische Methoden	39
3.6.1	Herstellung von Kryo-Gewebeschnitten	39
3.6.2	Herstellung von Paraffinschnitten	39
3.6.3	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung von Kryo- und Paraffingewebeschnitten	39
3.6.4	Detektion apoptotischer Zellen in Gefrierschnitten durch TUNEL-Assays (Wijsman <i>et al.</i> , 1993)	40

4	Ergebnisse	41
4.1	Molekulare Charakterisierung Ad12-E1A/E1B-transformierter Mauszelllinien	41
4.1.1	Analyse der Ad12-E1Awt/E1Am-Zelllinien auf Integration der genomischen Ad12-E1A-Region oder entsprechender Ad12-E1A-cDNAs	42
4.1.2	Nur die Zelllinien, die das Ad12-E1Awt-Konstrukt integriert haben, können die mRNAs für die Proteine Ad12-E1A _{10S/11S} und Ad12-E1A _{9,5S} prozessieren	44
4.1.3	Untersuchung des Integrationsmusters der Ad12-E1A-, Ad12-13S- und Ad12-E1B-Konstrukte im Genom der transformierten BMK-Zelllinien	47
4.1.4	Untersuchung der Expression der adenoviralen Proteine Ad12-E1A und Ad12-E1B in den transformierten Zelllinien	49
4.1.5	Die Fähigkeit der transformierten BMK-Zelllinien in Weichagar zu wachsen ist unabhängig von der Expression der Proteine Ad12-E1A _{10S/11S} und Ad12-E1A _{9,5S}	51
4.2	Untersuchung der Tumorigenität der transformierten BMK-Zelllinien <i>in vivo</i>	53
4.2.1	Der Verlust der Fähigkeit zur Expression des Ad12-E1A _{9,5S} - und des Ad12-E1A _{10S/11S} -Proteins korreliert mit einer verlängerten Latenzzeit bis zur Bildung von Tumoren in immundefizienten Mäusen	53
4.2.2	Die verlängerte Latenzzeit bei der Tumorinduktion durch die Ad12-E1Am-Zelllinien ist nicht die Folge einer verlangsamten Proliferation	56
4.2.3	Ad12-E1Am-transformierte Zelllinien, die das Ad12-E1A _{9,5S} - und das Ad12-E1A _{10S} -Protein nicht exprimieren, zeigen eine verringerte Fähigkeit zur Tumorinduktion in immunkompetenten syngen Mäusen	57
4.2.4	Die regressiven Tumoren zeigen ausgedehnte nekrotische Bereiche und apoptotische Zellen in überwiegend vitalen Tumorregionen	60
4.2.5	Die Ad12-E1Am-Zelllinien zeigen im Gegensatz zu den Ad12-E1Awt-Zelllinien eine verminderte Repression der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression	63
4.3	Die Rolle des Kofaktors p300 bei der onkogenen Transformation primärer BMK-Zellen durch Ad12-E1A/E1B	68
4.3.1	Eine hohe Expression von Ad12-E1A/E1B in Ad12-E1-transformierten BMK-Zelllinien korreliert mit einer erhöhten endogenen Konzentration des zellulären Kofaktors p300	68
4.3.2	Eine verlängerte Halbwertszeit der p300-Moleküle ist die Ursache für die erhöhte p300-Konzentration in Ad12-E1A hoch-exprimierenden Zelllinien	70

4.3.3	Die p300-Konzentration in der niedrig Ad12-E1A-exprimierenden Zelllinie Ad12-E1Awt2 wird durch die Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG-132 erheblich gesteigert	71
4.3.4	Die Expression von Ad12-E1A in Ad12-infizierten C33A-Zellen korreliert mit einer Erhöhung der p300-Konzentration	72
5	Diskussion	75
5.1	Die Proteine Ad12-E1A _{10S/11S} und Ad12-E1A _{9,5S} sind für die Transformation durch Ad12-E1A nicht essentiell	76
5.2	Die Expression der Ad12-E1Awt-Region führt zu einer verkürzten Latenzzeit bei der Tumorinduktion in Nacktmäusen	77
5.3	Nur die Ad12-E1Awt-Zelllinien bilden mit hoher Effizienz Tumoren in immunkompetenten syngen Tieren	79
5.4	Die Onkogenität der transformierten BMK-Zelllinien korreliert mit einer unterschiedlich hohen Dichte an MHC-Klasse-I-Molekülen auf Ad12-E1Awt- und Ad12-E1Am-Zelllinien	81
5.5	Die Regression von Tumoren in immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen ist wahrscheinlich die Folge einer NK-Zell-Antwort des Wirtstiers und/oder einer Minderversorgung des Tumorgewebes	84
5.6	Eine hohe Expression von Ad12-E1A korreliert mit einer erhöhten Stabilität des zellulären Kofaktors p300	86
6	Zusammenfassung und Ausblick	90
7	Literaturverzeichnis	92
8	Publikationen	107
9	Lebenslauf	108
10	Erklärungen	109

1. Einleitung

Viren besitzen weder eine eigene Proteinbiosynthesemaschinerie noch energiebildende Stoffwechselsysteme. Um sich replizieren zu können, infizieren sie daher lebende Zellen, deren Prozesse sie zugunsten ihrer Replikation modifizieren. In seltenen Fällen führt die Virusinfektion jedoch zur onkogenen Transformation der betroffenen Zelle. Die Onkogenität der transduzierenden Retroviren beruht z. B. auf der Tatsache, dass sie virale Onkogene zellulärer Herkunft wie z. B. *v-myc* oder *v-jun* zusammen mit ihrer eigenen Erbinformation in die Zell-DNA integrieren, was zu einer Überexpression der Onkogene in der Zelle führt (als Übersicht siehe Nevins und Vogt, 1996). Dagegen exprimieren DNA-Tumoviren wie Polyomaviren oder Adenoviren virale Onkogene, die in eine Vielzahl zellulärer Prozesse eingreifen. Dazu interagieren diese Onkogene mit zellulären Faktoren, wie z. B. dem Retinoblastom-Suszeptibilitätsprotein pRB oder dem Tumorsuppressorprotein p53 (als Übersicht siehe Gallimore und Turnell, 2001), die an der Steuerung essentieller zellulärer Funktionen wie der Zellzyklusregulation, der Differenzierung oder der Apoptose (programmierter Zelltod) beteiligt sind und somit das Zellschicksal entscheidend beeinflussen. Als Folge derartiger Manipulationen kann es ebenfalls in seltenen Fällen vorkommen, dass die betroffene Zelle der natürlichen Kontrolle entzogen wird.

Seit der Entdeckung ihrer tumorigenen Eigenschaften werden Adenoviren als Modellsystem für die Onkogenese verwendet. So konnte bis heute eine Vielzahl von Mechanismen, die an der Transformation eukaryontischer Zellen sowie deren maligner Entartung beteiligt sind, durch die Untersuchung von Adenovirus-Wirtszell-Systemen und der Folgen des Eingriffs viraler Proteine in zelluläre Abläufe aufgeklärt werden.

1.1. Adenoviren

Adenoviren zählen zur Familie der *Adenoviridae*, die sich in die Gattungen *Aviadenovirus* (Vogel-Adenoviren) und *Mastadenovirus* (Säuger-Adenoviren) gliedern (Norrby *et al.*, 1976). Humanpathogene Adenoviren wurden erstmals 1953 von Rowe und Mitarbeitern aus chirurgisch entferntem Rachenmandelgewebe („adenoid tissue“) isoliert. Sie verursachen beim Menschen zumeist milde Infektionen epithelialer Zellen des respiratorischen Trakts, des

Gastrointestinaltrakts, der Harnwege oder der Bindehaut des Auges (als Übersicht siehe Horwitz, 1990).

Adenoviren zählen zu den DNA-Tumoviren. Bis heute wurden mehr als 45 humanpathogene Ad-Serotypen beschrieben. Diese werden nach unterschiedlichen Kriterien, wie z. B. der DNA-Sequenzhomologie, dem Muster nach Restriktionsendonukleaseverdau des viralen Genoms, Haemagglutinations-Reaktionen mit Ratten- und Rhesusaffenerythrocyten, ihrer Onkogenität in Nagern und der Polypeptid-Zusammensetzung des Virions, in sechs Subgenera (A-F) eingeteilt (als Übersicht siehe Bailey und Mautner, 1994).

Das ikosaedrische Virion der Adenoviren ist nicht membranumschlossen und hat einen Durchmesser von 70-90 nm. Es beinhaltet das Virus-Genom in Form eines linearen, doppelsträngigen DNA-Moleküls, das eine Größe von 36-38 kbp aufweist (als Übersicht siehe Flint und Broker, 1981). Das Capsid des Virions setzt sich aus 240 Hexoncapsomeren und 12 Pentoncapsomeren zusammen (als Übersicht siehe Philipson, 1983). Die Pentoncapsomere tragen auf ihrer Oberfläche verankerte Fiber-Proteine, die der Anheftung des Virus an einen spezifischen Rezeptor dienen. Einige Vertreter der Adenovirus-Untergruppen A, C, D, E und F nutzen das sog. CAR-Protein als Fiber-Rezeptor (Roelvink *et al.* 1998). Das CAR-Protein ist eine Komponente der sog. tight junctions, die für die Verbindung benachbarter Einzelzellen im Zellverband verantwortlich sind (Cohen *et al.*, 2001). Eine Ausnahme stellt hierbei das Untergruppe-D-Adenovirus Ad30 dar, dessen Transduktion nicht über die Interaktion des Fiber Proteins mit dem CAR-Rezeptor verläuft (Law und Davidson, 2002). Der Eintritt des Virions in die Zelle erfolgt endozytotisch als Folge der Interaktion der Penton-Proteine mit einem Rezeptor der α V-Integrin-Rezeptor-Familie. Diese Interaktion bewirkt die Abstoßung der Fiber-Proteine und das Eindringen des Virions in frühe Endosomen über sog. Clathrin coated pits (als Übersicht siehe Cullan, 2001). Ausgelöst durch eine Ansäuerung des Milieus in den Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung des Virions, die die Zerstörung der frühen endosomalen Membran bewirkt und die Freisetzung der teilweise enthüllten Virionen zur Folge hat (Greber *et al.*, 1993). Diese gelangen nach dem Eintritt in das Zytoplasma, vermutlich durch Interaktion der Hexonkapsomere mit den Mikrotubuli, zu den Kernporen (Pastan *et al.*, 1987). Die Assoziation des Virions an die Kernmembran bewirkt den vollständigen Zerfall der Virushülle und den Import der mit viralen Proteinen komplexierten Virus-DNA in den Zellkern (Greber *et al.*, 1997). Aktuelle Studien zufolge fungiert das sog. Nuclear Pore Complex Protein CAN/Nup24 des Kernporenkomplexes als Interaktionsprotein für Ad2-Kapside (Trotman *et al.*, 2001). Wichtig für die Freisetzung der Virus-DNA ist zudem die

Interaktion von Histon H1 und H1-Importfaktoren mit dem Viruskapsid (Trotman *et al.*, 2001).

Bezüglich des Infektionsverlaufes nach Eintritt in die Wirtszelle unterscheidet man bei humanpathogenen Adenoviren zwei mögliche Formen: die **produktive Infektion** permissiver, humaner Zellen und die **abortive Infektion** nicht-permissiver Zellen (z. B. Nagerzellen).

1.1.1. Die produktive Infektion

Bei der produktiven Infektion kommt es zur Replikation der viralen DNA und letztendlich zur Lyse der Wirtszelle und zur Freisetzung von Virusnachkommen. Nach der Translokation des Virusgenoms in den Zellkern erfolgt die Expression der viralen Gene, die gemäß dem Zeitpunkt ihrer Expression in frühe (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4) und späte (L1-L5) Gene gegliedert werden (Broker *et al.*, 1984; siehe **Abb. 1**).

Die Genprodukte der frühen Regionen E1-E4 greifen in virale und zelluläre Abläufe ein, um eine geeignete Umgebung für eine Virusvermehrung zu schaffen. Die Region E1 wird in die distinkten Transkriptionseinheiten E1A und E1B unterteilt. Die Proteine der E1A-Region regulieren im Verlauf des lytischen Entwicklungszyklus die Expression der viralen sowie die Transkription einer Vielzahl zellulärer Gene (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995; Gallimore und Turnell, 2001). Die E1B-Region kodiert für zwei Proteine (19 kDa, 55 kDa), die unter anderem für die Akkumulation, die Stabilisierung, den Transport und die selektive Expression viraler mRNAs verantwortlich sind (Pilder *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1995, Gabler *et al.*, 1998). Eine weitere wichtige Funktion der E1B-Proteine im lytischen Zyklus ist die Inhibition der TNF α -induzierten Apoptose (Gooding *et al.*, 1991; White *et al.*, 1992). Die Region E2 kodiert für Proteine, die für die Virusreplikation essentiell sind. Hierzu zählen eine virale DNA-Polymerase, ein DNA-Bindeprotein und das terminale Protein (Sussenbach und van der Vliet, 1983). Die Produkte der E3-Region wirken der Immunantwort des Wirtsorganismus entgegen. Sie verhindern z. B. die Translokation der MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zellmembran (Burgert *et al.*, 1987) und die TNF-vermittelte Zelllyse (Gooding *et al.*, 1988). Die E4-Region kodiert für Proteine, die an der Regulation der viralen und der zellulären Genexpression sowie dem Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt sind. Auch induzieren sie in Kooperation mit den E1B-Proteinen die selektive Akkumulation viraler RNA (als Übersicht siehe Shenk, 1996).

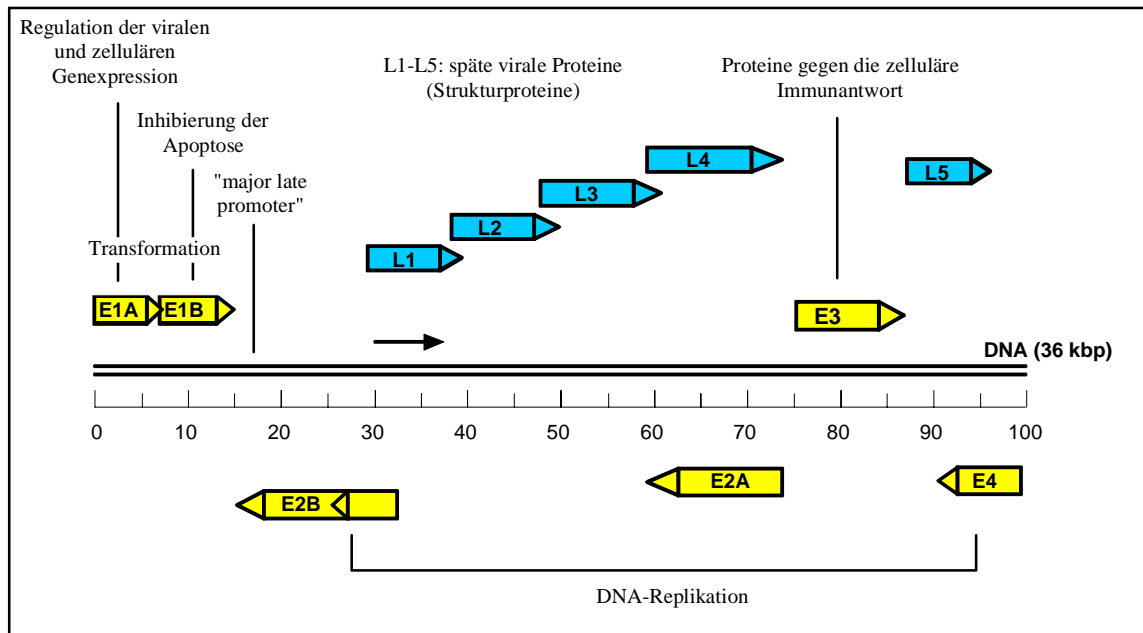


Abb. 1 Schematische Darstellung der Organisation des Genoms humanpathogener Adenoviren (nach Watson *et al.*, 1987). Das lineare doppelsträngige DNA-Molekül der Adenoviren wird in „map units“ (1-100) unterteilt. Die Transkriptionseinheiten gliedern sich in frühe (E = early; E1-E4) und späte (L = late; L1-L5) Regionen. Die Regionen E1-E4 werden jeweils durch einen eigenen Promotor reguliert. Die späten Regionen L1-L5 stehen dagegen unter der Kontrolle eines einzigen, des „major late promoters“. Wichtige Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind der jeweiligen Region zugeordnet.

Nach Beginn der späten Phase des viralen Entwicklungszyklus, ca. 5 h nach Infektion der Zelle, werden aus einer nukleären Vorläufer-RNA durch alternatives Spleißen mehr als 20 späte mRNAs synthetisiert, die in fünf Familien (L1-L5) eingeteilt werden (**Abb. 1**). Die späten mRNAs kodieren für virale Strukturproteine (z. B. Capsomere, Fiber) oder deren Vorläufer (als Übersicht siehe Flint und Broker, 1981). Diese werden anschließend in den Zellkern transportiert, in dem der Zusammenbau der infektiösen Virionen stattfindet (Horwitz *et al.*, 1969). Der produktive Zyklus endet mit dem Tod der Zelle und der Freisetzung infektiöser Virionen (Tooze 1981). Die Induktion der Zelllyse erfolgt unter Beteiligung des sog. „Adenovirus Death Protein“ (ADP), einem ca. 11 kDa großen Protein, das von der E3-Region kodiert wird (siehe z. B. Tollefson *et al.*, 1996).

1.1.2. Die abortive Infektion

Bei der Infektion nicht-permissiver Zellen durchlaufen humanpathogene Adenoviren einen abortiven Zyklus, in dessen Verlauf keine infektiösen Virionen gebildet werden (Doerfler, 1969). Das Virus gelangt, entsprechend dem produktiven Zyklus, in die Zelle. Dort erfolgt die

Expression der frühen Gene. Eine Virusvermehrung sowie die Expression der späten Regionen des Virusgenoms und die damit verbundene Bildung viraler Strukturproteine findet jedoch nicht statt (Esche *et al.*, 1979; Esche und Siegmann, 1982). Aktuelle Studien von Hösel und Mitarbeitern (2001) deuten darauf hin, dass eine zu niedrige Ad-E1A-Expression eine Ursache für das Ausbleiben der Replikation viraler DNA in abortiv infizierten Hamsterzellen ist, da bei Überexpression von Ad12-E1A in Ad12-infizierten BHK12-Zellen eine moderate DNA-Replikation stattfindet.

Die abortive Infektion führt in 1×10^{-6} - 1×10^{-5} Fällen zur Transformation der infizierten Zelle (van der Eb und Bernards, 1984). Das virale Genom integriert hierbei vollständig oder partiell in das Genom der Wirtszelle. Werden solche *in vitro* transformierten Zellen in immundefiziente Nager (z. B. Nacktmäuse) inokuliert, wachsen sie zu Tumoren aus. Obwohl alle Ad-Serotypen in immundefizienten Nagern ein Tumorwachstum induzieren können, sind nur die onkogenen Serotypen in der Lage, auch in immunkompetenten Tieren Tumoren zu erzeugen. Daher teilt man Adenoviren aufgrund ihrer unterschiedlichen Onkogenität in immunkompetenten Nagern auch in onkogene (z. B. Ad12, Ad31) sowie nicht-onkogene Adenoviren ein (z. B. Ad5, Ad2). Die onkogenen Serotypen werden weiterhin entsprechend dem Zeitraum bis zum Auftreten von Tumoren und der Häufigkeit, mit der die inokulierten Zellen in Nagern zu Tumoren auswachsen, in hoch-onkogene (z. B. Ad12 und Ad31) und schwach-onkogene (z. B. Ad3 und Ad7) Adenoviren eingeteilt (Wadell, 1984). Für die Transformation nicht permissiver Nagerzellen durch humanpathogene Adenoviren ist die konstitutive Expression der Genprodukte der E1A- und E1B-Region notwendig, aber auch hinreichend (van der Eb *et al.*, 1977; van der Eb und Bernards, 1984). Untersuchungen an Ad12/Ad2-Adenovirus-Chimären ergaben, dass das onkogene Potential der Adenoviren in immunkompetenten Nagern ausschließlich durch die Herkunft der E1A-Region bestimmt wird (Bernards *et al.*, 1983). Folglich muss davon ausgegangen werden, dass die unterschiedliche Tumorigenität der einzelnen Adenovirus-Serotypen in funktionellen Unterschieden der jeweiligen E1A-Region begründet liegt.

1.2. Die Struktur der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2

In **Abb. 2** ist der schematische Vergleich der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Ad12 und des nicht-onkogenen Ad2 dargestellt. Durch alternatives Spleißen entstehen aus der hnRNA der E1A-Region des hoch-onkogenen Ad12 sechs unterschiedliche mRNAs, die gemäß ihren Sedimentationskoeffizienten 13S, 12S, 11S, 10S, 9,5S und 9S genannt werden. Diese Transkripte kodieren für fünf verschiedene Proteine (Ad12-E1A_{13S}, Ad12-E1A_{12S}, Ad12-E1A_{10S/11S}, Ad12-E1A_{9,5S}, Ad12-E1A_{9S}; siehe **Abb 2**; Perricaudet *et al.*, 1980; Sawada und Fujinaga, 1980; Brockmann *et al.*, 1990). Alle mRNAs weisen identische 5'- und 3'-Termini auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe, da während der Prozessierung der Vorläufer-RNA unterschiedlich große Introns eliminiert werden.

Die beiden hauptsächlichen Genprodukte, Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S}, sind Proteine mit 266 bzw. 235 Aminosäuren. Beide Proteine besitzen das gleiche Leseraster, jedoch fehlt dem Ad12-E1A_{12S}-Protein als Folge des RNA-Spleißens eine interne Region von nt 976 bis nt 1069 (siehe **Abb. 2**; Brockmann und Esche, 1995). Dieser Abschnitt umfasst eine von drei E1A-Regionen, die über alle humanpathogenen Adenovirus-Serotypen hoch konserviert sind (Kimelmann *et al.*, 1985) und demnach als konservierte Regionen 1-3 (CR1, CR2, CR3) bezeichnet werden (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995). Zwischen CR2 und CR3 von Ad12-E1A liegt eine 20 Aminosäuren umfassende Sequenz, der sog. Spacer, der in der E1A-Region nicht-onkogener Adenoviren (z. B. Ad2/5) fehlt. Eine ähnliche etwas längere Sequenz findet sich in den E1A-Proteinen von *simian virus 7* (SA7). Ein leicht verkürzter Spacer tritt bei dem schwach-onkogenen Ad3 auf (Telling und Williams, 1994). Durch den Einsatz von Spacermutanten wurde der Spacer im Tierversuch als eine der onkogenen Determinanten in Ad12-E1A identifiziert (Jelinek *et al.*, 1994; Telling und Williams, 1994).

Im Fall der 11S-, 10S-, 9,5S- und 9S-mRNAs führen Spleißvorgänge zu einer Änderung des Leserahmens nach Aminosäure 29. Von diesen mRNAs werden Proteine mit 106 (Ad12-E1A_{10S/11S}), 52 (Ad12-E1A_{9,5S}) bzw. 55 (Ad12-E1A_{9S}) Aminosäuren translatiert. Sie beinhalten keine der konservierten Regionen und zeigen, mit Ausnahme des N-terminalen Bereichs, keinerlei Sequenzhomologien zu den Proteinen Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} (Brockmann und Esche, 1995). Die 11S- und 10S-mRNAs liefern, hervorgerufen durch ein Stopkodon vor der zweiten Spleißstelle, ein identisches Protein. Die Struktur der 9S-mRNA

ist zwischen allen Adenovirus-Serotypen über weite Bereiche hoch konserviert (Perricaudet *et al.*, 1980).

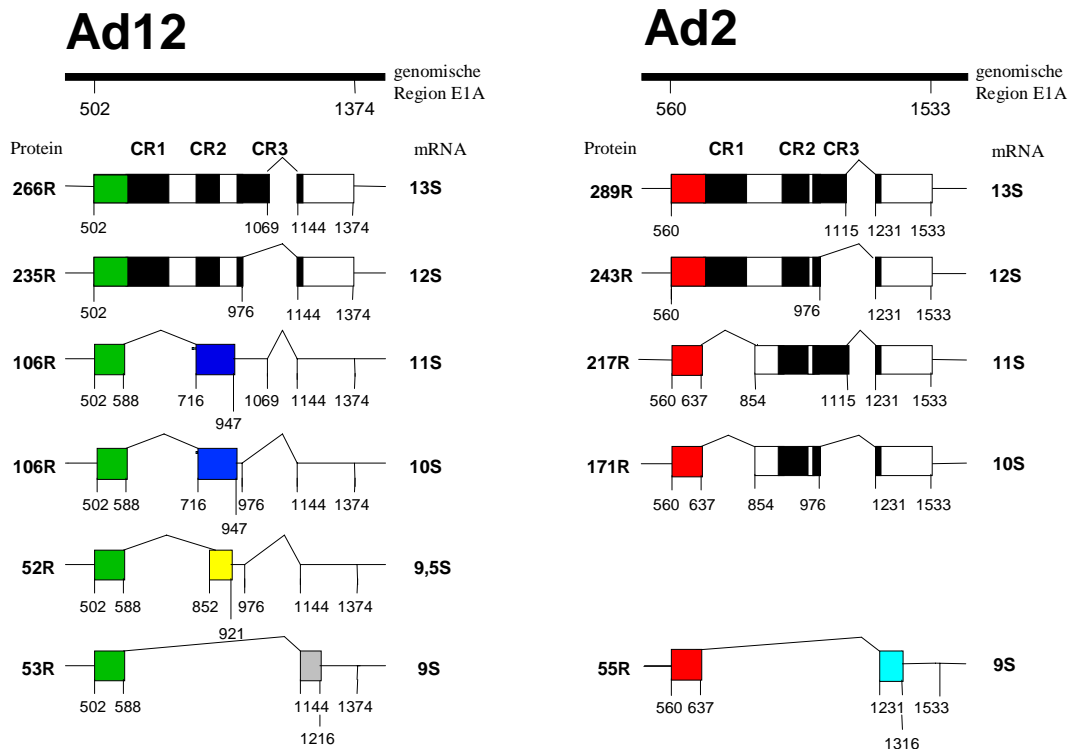


Abb. 2 Vergleich der Struktur der mRNAs und davon abgeleiteter Proteine der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Ad12 und des nicht-onkogenen Ad2. Die Rechtecke bezeichnen die von den unterschiedlichen mRNAs translatierten Proteine. Die schwarzen Rechtecke stellen die zwischen Ad12 und Ad2 konservierten Regionen 1 bis 3 (CR1-CR3) dar. Die Zahlen unter den Linien geben die Position der Nukleotide im adenoviralen Genom an. Sie bezeichnen die Lage des gemeinsamen Startkodons, der Spleißstellen und des Stopkodons. Die farbigen Rechtecke weisen auf unterschiedliche Leserahmen innerhalb eines Serotyps hin. (R) Aminosäurerest; (S) Svedberg-Einheit (nach Brockmann und Esche, 1995).

Die E1A-Region des nicht-onkogenen Ad2 (siehe **Abb. 2**) liefert durch alternatives Spleißen einer hnRNA fünf unterschiedliche mRNAs (13S, 12S, 11S, 10S, 9S; Stephens und Harlow, 1987; Ulfendahl *et al.*, 1987). Aus diesen mRNAs entstehen fünf verschieden große Proteine mit 289 (Ad2-E1A_{13S}), 243 (Ad2-E1A_{12S}), 217 (Ad2-E1A_{11S}), 171 (Ad2-E1A_{10S}) und 55 (Ad2-E1A_{9S}) Aminosäuren. Anders als bei Ad12-E1A kommt es bei Ad2-E1A lediglich im Fall des Ad2-E1A_{9S}-Proteins zu einer Verschiebung des Leserahmens. Die übrigen Proteine werden im gleichen Leseraster gelesen und unterscheiden sich nur durch das Fehlen einzelner konservierter Regionen (Stephens und Harlow, 1987; Ulfendahl *et al.*, 1987).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das onkogene Potential von Ad12 in der E1A-Region lokalisiert ist, weist der Vergleich der E1A-Regionen von Ad12 und Ad2 auf mögliche onkogene Determinanten hin. Besonders hervorzuheben sind hierbei der Spacer sowie die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S}, zu denen in der E1A-Region von Ad2 kein Äquivalent existiert. Mitverantwortlich für die Onkogenität bestimmter Adenoviren sind vermutlich neben diesen auch andere nicht-konservierte Bereiche, wie z. B. der Aminoterminal. Für diesen E1A-Bereich wurden bereits unterschiedliche Funktionen bei den verschiedenen Ad-Serotypen nachgewiesen (Lipinski *et al.*, 1999).

1.2.1. Die Funktionen der Proteine Ad-E1A_{13S} und Ad-E1A_{12S}

E1A-Proteine besitzen keine intrinsische sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität (Ferguson *et al.*, 1985), sondern vermitteln ihre transregulatorischen Funktionen über die Interaktion mit zellulären Faktoren. Die Fähigkeit von Ad-E1A, die Transkription zellulärer wie viraler Gene zu regulieren, liegt in der Tatsache begründet, dass die E1A-Proteine mit einer Reihe zellulärer Proteine wie Transkriptionsfaktoren (z. B. ATF-2, YY1), Koaktivatoren (p300/CBP), Korepressoren (CtBP), Chromatin modulierenden Faktoren (SWI/SNF) oder Proteinen der generellen Transkriptionsmaschinerie und Mediatorkomplexen (TBP, TAFs, hSUR2) interagieren (Bayley und Mymryk, 1994; Mymryk und Smith, 1997; Boyer *et al.*, 1999; als Übersicht siehe Gallimore und Turnell, 2001; siehe auch **Abb. 3**). Dabei wird vermutet, dass die transregulierenden Funktionen von Ad-E1A zum Teil auf der Modulation der HAT-Aktivität von Kofaktoren wie p300/CBP oder pCAF beruhen (als Übersicht siehe Gallimore und Turnell, 2001). Im lytischen Entwicklungszyklus aktivieren die E1A-Proteine die Expression der adenoviralen Regionen E1B, E2, E3, E4 und L1-L5 (Berk, 1986). Die Aktivierung verläuft hierbei generell über CR3, die eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren bindet, mit generellen Faktoren interagiert und selber als Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne fungiert (Jones, 1995; als Übersicht siehe Brockmann und Esche 1995; Gallimore und Turnell, 2001). Das transaktivierende Potential von CR3 korreliert zudem mit der Fähigkeit von E1A an hSUR, einer Komponente eines transkriptionellen Mediatorkomplexes, zu binden (Boyer *et al.*, 1999). Weitere wichtige Interaktions- und Aktivierungsdomänen sind neben CR3 der nicht konservierte N-Terminus, CR1 und CR2 sowie das Exon 2, das die Interaktionsdomäne für den zellulären Repressor CtBP beinhaltet.

Neben der viralen Genexpression reguliert E1A auf vielfältige Weise die Expression zellulärer Gene. Aktiviert wird z. B. die Transkription von *c-myc*, *c-jun* oder β -Tubulin. Durch die physikalische Interaktion von Ad-E1A mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und ATF-2 werden die E1A-Proteine an die entsprechenden Zielpromotoren rekrutiert (Liu und Green, 1990). Diese Interaktion bewirkt z. B. die transkriptionelle Aktivierung des c-Jun-Promotors. C-Jun ist an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie der Differenzierung oder der Proliferation beteiligt (Angel und Karin, 1991). Man geht heute davon aus, dass die erhöhte Expression von c-Jun durch Ad-E1A im lytischen Infektionszyklus essentiell ist, da c-Jun in Signalkaskaden eingebunden ist, die arretierten Zellen den Wiedereintritt in den Zellzyklus erlauben. Eine zweite Möglichkeit, wie E1A den Zellzyklus in der Zelle anzuschalten vermag, ist die Aktivierung der E2F-responsiblen Genexpression zellzyklusrelevanter Gene (Ikeda und Nevins, 1993). Durch die Interaktion von CR1 und CR2 mit pRB werden transkriptionsaktive E2F-Proteine aus dem inhibitorischen Komplex mit pRB freigesetzt und initiieren so z. B. die Expression der Gene der Dihydrofolatreduktase oder der Thymidinkinase (siehe auch Abschnitt 1.2.2; Whyte *et al.*, 1988A). Zudem interferiert E1A mit der Interaktion von pRB mit Chromatin-modulierenden Faktoren wie Histon-Deacetylasen (HDACs) und den Bestandteilen des SWI/SNF-Komplexes hBRM und BRG und hebt dadurch den pRB-induzierten Zellzyklusarrest auf (Strober *et al.*, 1996; als Übersicht siehe Gallimore und Turnell, 2001).

Repressorisch wirken Ad12-E1A-Proteine beispielsweise auf die Expression der Gene, die für Insulin, Fibronectin oder Kollagen kodieren (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995), sowie auf die p53-abhängige Aktivierung von Zielpromotoren. Die Interaktion des Ad12-E1A_{12S}-Proteins mit den zellulären Koaktivatoren p300/CBP führt im Fall von p53 zur Dissoziation der Koaktivatoren aus promotorgebundenen Transkriptionsfaktorkomplexen (Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997).

In **Abb. 3** sind die Proteine Ad-E1A_{13S} und Ad-E1A_{12S} mit ihren funktionellen Domänen (**A**, **B**) sowie die Bereiche dargestellt, über die die viralen Proteine mit zellulären Faktoren (**C**) interagieren (verändert nach Brockmann und Esche, 1995).

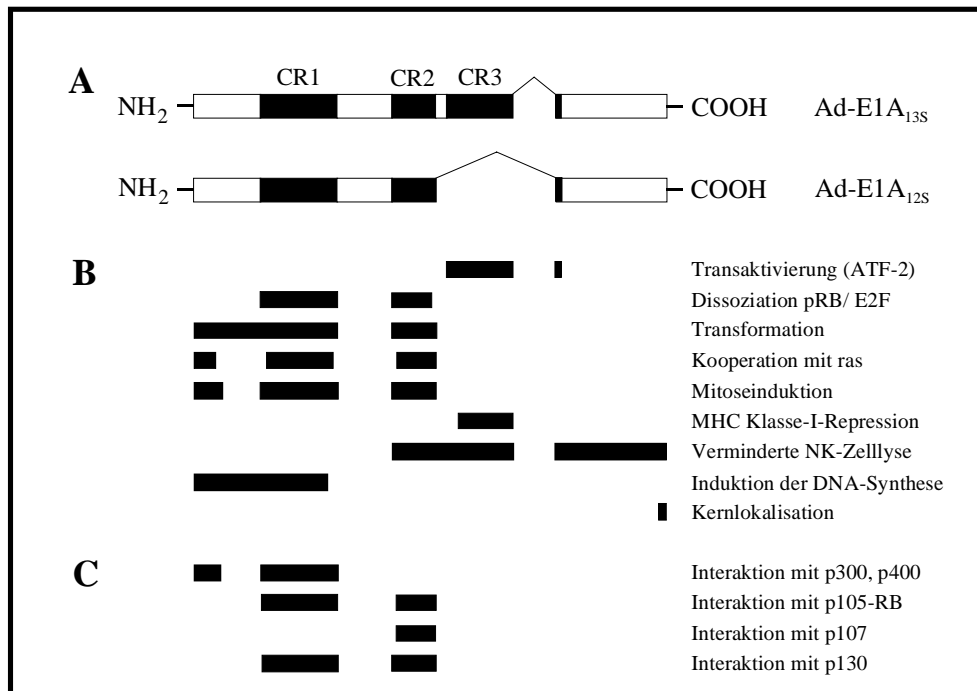


Abb. 3 Darstellung der E1A-Proteine, ihrer funktionellen Domänen und der für die physikalische Interaktion mit zellulären Faktoren essentiellen Regionen. (A) Die Proteine Ad-E1A_{13S} und Ad-E1A_{12S} sind als Rechtecke dargestellt. Die konservierten Regionen CR1-CR3 sind schwarz ausgefüllt. (B) Regionen, die funktionelle Domänen der E1A-Proteine repräsentieren, sind als ausgefüllte Rechtecke dargestellt. (C) Ausgefüllte Rechtecke symbolisieren Bereiche der E1A-Proteine, die für die physikalische Interaktion mit einigen ausgewählten zellulären Faktoren von essentieller Bedeutung sind.

1.2.2. Transformation durch Adenoviren

Alle bis heute bekannten humanpathogenen Adenoviren können nicht-permissive Zellen transformieren und in immundefizienten Nagern (z. B. Nacktmäusen) ein Tumorwachstum induzieren (als Übersicht siehe Williams *et al.*, 1995; siehe auch 1.1.2). Der Prozess der zellulären Transformation durch adenovirale Genprodukte ist eine Folge der konstitutiven Expression der E1A- und E1B-Proteine. Die Proteine der E1A-Region bewirken hierbei zunächst die Immortalisierung der Zelle (Houweling *et al.*, 1980; Ruley, 1983). Die Genprodukte der E1B-Region dienen der Ausbildung des vollständig transformierten Phänotyps, hauptsächlich durch Inhibition der E1A-induzierten Apoptose (als Übersicht siehe White, 1995), haben jedoch selber keine transformierenden Eigenschaften (van den Elsen *et al.*, 1983). Merkmale der vollständigen Transformation sind z. B. die Aufhebung der Kontaktinhibition, die morphologische Umgestaltung der Zelle und die Fähigkeit, unabhängig von Verankerungsflächen wachsen zu können (Jochemsen *et al.*, 1982; Byrd *et al.*, 1988).

Die Induktion des Zellzyklus während der produktiven Infektion ist eine wichtige Funktion der E1A-Proteine, da dadurch die Bereitstellung essentieller Bausteine für die Virusreplikation durch die Zelle gewährleistet wird. Da in nicht-permissiven Zellen keine Virusreplikation stattfindet, die Zelle aber dennoch kontinuierlich im Zellzyklus gehalten wird, kann deren Infektion in seltenen Fällen zu einer Immortalisierung führen. Dieser Vorgang der Immortalisierung primärer Zellen durch die Genprodukte der E1A-Region ist zu einem großen Teil das Resultat der E1A-abhängigen Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aus inhibitorischen Komplexen mit pRB (Whyte *et al.*, 1988A). So freigesetztes aktives E2F trägt zusammen mit dem zellulären Faktor DP-1 als Heterodimer zur Aktivierung zahlreicher, für das Durchlaufen der S-Phase notwendiger Gene, z. B. der Dihydrofolatreduktase, der Thymidinkinase, von c-myc oder Zyklin-E bei (Moran, 1994; Slansky und Farnham, 1996; als Übersicht siehe Zhang und Dean, 2001). E1A-Proteine binden pRB über CR1 und CR2 und bewirken dadurch die Dissoziation des pRB/E2F-Komplexes. Dadurch mimikriert E1A die Funktion von Zyklinen und Zyklin abhängigen Kinasen, welche die Dissoziation von E2F/pRB-Komplexen durch spezifische Phosphorylierung von pRB bewirken (Hollingsworth *et al.*, 1993; Moran 1994).

Auch die Interaktion der E1A-Proteine Ad-E1A_{13S} und Ad-E1A_{12S} mit dem nukleären Phosphoprotein p300 (Wang *et al.*, 1993) sowie seinem Homolog CBP spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Immortalisierung und der Transformation primärer Zellen. Transformationsstudien ergaben, dass sich die ektopische Überexpression von p300 oder CBP inhibierend auf die Transformation durch E1A auswirkt (Smits *et al.*, 1996). Untersuchungen von Kolli und Mitarbeitern (2001) belegen zudem, dass p300 eine entscheidende Funktion bei dem Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase ausübt. Die durch entsprechende Antisense-RNA verursachte Verringerung der p300-Proteinkonzentration in immortalisierten humanen Brustzellen (MCF10A) induzierte bei diesen Zellen den Austritt aus der G1-Phase trotz Arretierung durch Serumentzug. Der gleiche Effekt konnte durch Expression von Ad-E1A in Abhängigkeit einer intakten p300-Interaktionsdomäne erzielt werden, was darauf hindeutet, dass p300-Proteine eine zellzyklushemmende Funktion ausüben, die durch die Interaktion mit E1A blockiert wird. Diese Ergebnisse können jedoch auch so interpretiert werden, dass die Rekrutierung von p300 durch E1A an Promotoren transformationsrelevanter Gene für die Transformation einer Zelle essentiell ist. Aktuelle Studien von Fuchs *et al.* (2001) zeigen, dass auch die Interaktion von E1A mit einem zellulären Komplex, bestehend aus p400 und TRRAP/PAF400, für die Transformation von entscheidender Bedeutung ist, da E1A-Mutanten, die nicht an p400 binden, primäre Zellen nicht mehr transformieren konnten.

Neben der Expression der E1A-Region ist zur Transformation einer Zelle die konstitutive Expression der Region E1B oder die eines anderen kooperierenden Onkogens bzw. proto-Onkogens, wie z. B. der aktivierten Form des Ras-Proteins (Byrd *et al.*, 1988) oder Bcl-2 (Sabbatini *et al.*, 1995), essentiell. Die E1B-Region von Ad12 kodiert für ein 55 kDa und ein 19 kDa großes Protein. Eine im Zuge der Transformation essentielle Funktion von E1B ist die Inhibition der p53-vermittelten Apoptose (Sarnow *et al.*, 1982), hervorgerufen durch die Expression der E1A-Proteine. E1A induziert die Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 (Debbas und White, 1993) und verhindert wahrscheinlich zudem die p300-abhängige Degradation von p53 durch den negativen Regulator MDM2 (Grossman *et al.*, 1998). Die Akkumulation von p53 hätte dann zunächst eine Arretierung der Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus und letztendlich den programmierten Zelltod zur Folge (als Übersicht siehe Lane, 1992). Das E1B-19 kDa-Protein, ein Homolog des zellulären Onkogens Bcl-2, bindet an das proapoptotische Bax-Protein, verhindert die Bildung des 500 kDa großen Bax-Komplexes und unterdrückt dadurch die TNF- α -induzierte Apoptose (Han *et al.*, 1996; Sundararajan und White, 2001). Das E1B-19 kDa-Protein aktiviert zudem die Transkription des MDM2-Gens, dessen Genprodukt einen natürlichen Inhibitor von p53 darstellt (Thomas und White, 1998). Das E1B-55 kDa-Protein von Ad5 bindet direkt an p53 (Sarnow *et al.*, 1982) und verhindert dadurch die Transaktivierung der Zielgene von p53. Das E1B-55 kDa-Protein von Ad12 bindet p53 in Ad12-transformierten Zellen mit sehr viel geringerer Effizienz (Grand *et al.*, 1994), wirkt jedoch ebenfalls der p53-vermittelten Transaktivierung entgegen (Grand *et al.*, 1996).

Auch die Proteine E4orf6 und E4orf3 von Ad5 können gemeinsam mit E1A primäre Zellen transformieren (siehe z. B. Moore *et al.*, 1996). Interessanterweise ist eine Expression der E4-Proteine nach Ablauf dieser sog. „Hit-and-Run“-Transformation zur Aufrechterhaltung des transformierten Status nicht mehr erforderlich (Nevels *et al.*, 2001).

1.2.3. Die Onkogenität der E1A-Region von Ad12

Die Ursachen für die unterschiedliche Onkogenität der einzelnen Ad-Serotypen in immunkompetenten Tieren sind bis heute nicht vollständig verstanden. Zwar wurde der Spacer (siehe Abschnitt 1.2) als eine der onkogenen Determinanten von Ad12 identifiziert, die molekulare Funktion dieses Ad12-E1A-Elements im Transformationsprozess ist jedoch bis heute nicht geklärt.

Von großer Bedeutung für die Onkogenität von Adenoviren ist die Fähigkeit einiger Adenovirus-Serotypen, die transformierten Zellen gegen die Eliminierung durch das zelluläre Immunsystem des Wirtsorganismus zu schützen. Virusinfizierte Zellen werden in immunkompetenten Tieren normalerweise durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zerstört. Die T-Zell-Immunantwort des Wirtstiers ist eine Folge der Präsentation, zuvor in der Zelle prozessierter, viraler Antigene durch den MHC-Klasse-I auf der Zelloberfläche (als Übersicht siehe Nabholz und MacDonald, 1983). So markierte Zellen werden durch die CTLs erkannt und eliminiert. Das erhöhte onkogene Potential von Ad12- gegenüber Ad2/5-transformierten Zellen korreliert offenbar mit einer reduzierten Expression von Molekülen des MHC-Klasse-I auf der Oberfläche der transformierten Zellen (Bernards *et al.*, 1983; Friedmann und Ricciardi, 1988) und einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber der Lyse durch NK-Zellen (Cook *et al.*, 1987). Huvent *et al.* zeigten 1997, dass für die verringerte Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle auf Ad12-E1A/E1B-transformierten Zellen u. a. die C-terminale Domäne der konservierten Region 3 und für die reduzierte Empfindlichkeit gegenüber der Elimination durch NK-Zellen zumindest der C-terminale Bereich ab CR2 von Ad12-E1A benötigt werden (siehe auch **Abb. 3 B**).

Die Unterdrückung der MHC-Klasse-I-Expression verläuft hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene durch Repression des MHC-Klasse-I-Promotors. Ad12-E1A reprimiert die MHC-Klasse-I-Expression über ein als „Enhancer A“ bezeichnetes Promotorelement, das den Bereich von nt -199 bis nt -159 relativ zum Transkriptionsstart des MHC-Promotors ausmacht (siehe z. B. Schouten *et al.*, 1995). Die synergistische Aktivierung dieses Promotorelements verläuft über Bindestellen für NF- κ B- und c-Jun/AP-1-Transkriptionsfaktoren (Shirayoshi *et al.*, 1987; Korber *et al.*, 1988; Yamit-Hezi *et al.*, 1994; Brockmann *et al.*, 1999). Das E1A_{13S}-Protein von Ad12 interferiert mit der Aktivierung des Promotors durch den zellulären Transkriptionsfaktor NF- κ B (Schouten *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996), der als Heterodimer aus p50/p65 an eine spezifische Erkennungssequenz im Enhancer A bindet. Kushner und Ricciardi zeigten 1999, dass die p50-Untereinheit von NF- κ B in Ad12-transformierten Zellen in hypophosphorylierter Form vorliegt. Dadurch wird die Affinität von NF- κ B zu seiner Zielsequenz reduziert und somit die Aktivierung des MHC-Promotors in diesen Zellen inhibiert, ohne dass die absolute Konzentration nukleären NF- κ Bs beeinflusst wird. In Extrakten aus Ad5-transformierten Zellen wurde ein derartiges Phänomen nicht beobachtet. Schouten und Mitarbeiter (1995) hingegen führen die Repression des MHC-Klasse-I-Promotors darauf zurück, dass die Menge verfügbarer p50-NF- κ B-Untereinheiten

durch Ad12-E1A_{13S} reduziert wird. Das Ad12-E1A_{13S}-Protein verhindert dabei die Prozessierung der p105-NF- κ B-Vorstufe zu p50. Neben dem Ad12-E1A_{13S}-Protein ist jedoch auch das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein in der Lage, die MHC-Klasse-I-Expression in transienten Expressionsstudien zu reprimieren (Brockmann *et al.*, 1996; siehe auch Abschnitt 1.2.4).

Hemmend auf die MHC-Klasse I-Expression wirkt auch der nukleäre Orphan-Hormon-Rezeptor COUP-TF. Untersuchungen mehrerer Autoren haben gezeigt, dass die Affinität von COUP-TF zu seiner Erkennungssequenz im MHC-Promotor in Ad12-transformierten Zellen wesentlich stärker ist als in Zellen, die durch Ad5 transformiert sind (Ackrill und Blair, 1989; Ge *et al.*, 1992; Kralli *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994). Aus aktuellen Studien geht zudem hervor, dass neben der DNA-Bindeaktivität auch die Expression von COUP-TF II in Ad12-transformierten Zellen gegenüber Ad5-transformierten Zellen wesentlich erhöht ist (Smirnov *et al.*, 2001).

Die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche Ad12-infizierter Zellen wird jedoch auch indirekt über die Repression der Transkription von Mitgliedern des Proteasomenkomplexes (LMP2 und LMP7) und des Peptidtransporters TAP-2 reprimiert (Rotem-Yehudar *et al.*, 1996). Dadurch wird nicht die Generierung von MHC-Molekülen auf transkriptioneller Ebene inhibiert, sondern vielmehr deren Beladung mit endogen prozessierten Antigenen und deren Transport an die Zelloberfläche (Sparer und Gooding, 1998).

1.2.4. Die Rolle der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} bei der onkogenen Transformation

Die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} sind spezifische Genprodukte der E1A-Region des hoch-onkogenen Ad12. Man kann daher spekulieren, dass diese Ad12-E1A-Proteine für die selektive Onkogenität von Ad12 mitverantwortlich sind.

Erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins auf die transformierenden und onkogenen Eigenschaften von Ad12-E1A gaben Untersuchungen an der natürlich auftretenden Ad12-Mutante CS-1. Durch Deletion eines Segments von aa 834 bis aa 902 im Spacerbereich des E1A-Gens geht der Spleißakzeptor für die 9,5S-mRNA verloren (Opalka *et al.*, 1992). Infolgedessen kann das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein nicht generiert werden. Diese Mutante ist weder zur Transformation noch zur Immortalisierung von Nagerzellen *in vitro* in der Lage (Opalka *et al.*, 1992). Interessanterweise kann auch die von

Jelinek und Mitarbeitern 1994 untersuchte nicht-onkogene Spacerdeletionsmutante von Ad12-E1A (siehe auch **1.2.3**) das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein nicht mehr generieren, was einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung dieses Proteins an der Onkogenität von Ad12-E1A darstellt. Ein dritter Hinweis darauf, dass Ad12-E1A_{9,5S} für die Onkogenität von Ad12 mitverantwortlich sein könnte, ist sein inhibitorischer Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung bestimmter Promotoren durch c-Jun/AP-1-Transkriptionsfaktoren. So unterdrückt das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein z. B. die c-Jun/AP-1-abhängige Aktivierung des murinen MHC-Klasse-I-Promotors über ein AP-1-responsibles Element im Enhancer A (Brockmann *et al.*, 1996) und trägt dadurch möglicherweise zur Suppression der MHC-Klasse-I-Expression auf Ad12-transformierten Zellen bei. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Repression der c-Jun/AP-1-responsiblen Transkription eine Folge der physikalischen Interaktion von Ad12-E1A_{9,5S} mit c-Jun-Transkriptionsfaktoren ist. Durch diese Interaktion wird die Aktivierung von c-Jun/AP-1 durch c-Jun-abhängige Kinasen verhindert.

Über eine mögliche physiologische Funktion des Ad12-E1A_{10S/11S}-Proteins ist bis heute wenig bekannt. Im Gegensatz zu dem Ad12-E1A_{9,5S}-Protein ist Ad12-E1A_{10S/11S} jedoch nicht in der Lage, die MHC-Klasse-I-Expression in transienten Expressionsstudien zu reprimieren (pers. Mitteilung D. Brockmann).

1.3. Ziel der Arbeit

Aus den unter den Punkten **1.2.3** und **1.2.4** dargestellten Zusammenhängen ergibt sich die Fragestellung, ob die niedermolekularen Ad12-E1A-Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und/oder Ad12-E1A_{9,5S} für die Onkogenität der Ad12-E1A-Region von Bedeutung sind. Ziel der Arbeit war es, diese Fragestellung mit Hilfe von BMK-Zelllinien, die durch alternative Genprodukte der E1-Region von Ad12 transformiert sind, zu klären. Dazu wurden zwei verschiedene Zelltypen generiert: (I) Primäre BMK-Zellen, transformiert durch die Ad12-E1A-Wildtypregion in Kooperation mit Ad12-E1B (Ad12-E1Awt), und (II) BMK-Zellen, transformiert durch eine Ad12-E1A-Mutante ebenfalls in Kooperation mit Ad12-E1B (Ad12-E1Am). Das Ad12-E1Am-Konstrukt trägt eine Punktmutation im N-terminal gelegenen Spleißdonor. Durch den Austausch von Guanin mit Cytosin an der Position nt 588 wurde der Spleißdonor zerstört (Diplomarbeit O. Lehmkuhler, 1999, unveröffentlichte Daten). Somit können in Zellen, die dieses Konstrukt integriert haben, lediglich die mRNAs für das Ad12-E1A_{13S}- und das Ad12-E1A_{12S}-Protein prozessiert werden (siehe **Abb. 4**).

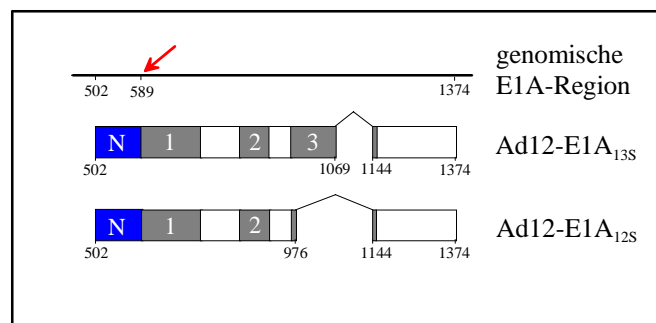


Abb. 4 Darstellung der Punktmutation im Ad12-E1Am-Konstrukt und der erwarteten Proteine. Die genomische Ad12-E1A-Region ist durch eine durchgehende Linie gekennzeichnet. Rechtecke repräsentieren Proteine und dünne Linien durch RNA-Spleißen entfernte Introns. Die konservierten Regionen CR1-CR3 sind durch graue Rechtecke gekennzeichnet. Die Zahlen unter der genomischen Ad12-E1A-Region und den dargestellten Genprodukten Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} geben die Position der entsprechenden Nukleotide im Genom von Ad12 wieder. Die Lage der Punktmutation in der Ad12-E1A-Region des Ad12-E1Am-Konstrukts ist durch einen roten Pfeil angezeigt. N: N-Terminus

Mit Hilfe der transformierten BMK-Zelllinien sollte in Onkogenitätsstudien an immundefizienten Nacktmäusen und an immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen untersucht werden, ob der Verlust der Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} einen Einfluss auf die Ausbildung eines onkogenen Phänotyps in den untersuchten Tiermodellen hat. Bevor die etablierten Zelllinien in Tierversuchen eingesetzt wurden, sollten

sie hinsichtlich einer Reihe wichtiger Eigenschaften, wie z. B. der genomischen Integration der Ad12-E1A-Sequenzen oder der Expression der Virusproteine, charakterisiert werden. Durch diese Untersuchungen sollte sichergestellt werden, dass für die anschließenden Tumorinduktionsversuche Zelllinien mit definierten Eigenschaften zur Verfügung stehen. Eine Analyse der MHC-Klasse-I Expression auf der Oberfläche der transformierten Zelllinien sollte zudem Auskunft darüber geben, ob diese durch die verschiedenen Ad12-E1A-Konstrukte in unterschiedlicher Weise reguliert wird. Die Tumorigenitätsstudien selbst sollten zeigen, ob eine Korrelation zwischen der Onkogenität der transformierten BMK-Zelllinien und der Fähigkeit zur Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} besteht.

Die onkogene Transformation der Wirtszelle durch Ad-E1A- und Ad-E1B ist die Folge ihrer Interaktion mit zellulären Faktoren. Die viralen Proteine regulieren dabei nicht nur die Expression zahlreicher Gene, sondern beeinflussen zudem direkt z. B. die Stabilität zellulärer transformationsrelevanter Faktoren (z. B. p53, Debbas und White, 1993). Ziel dieser Arbeit sollte demnach auch die Untersuchung des Einflusses von Ad12-E1A auf den zellulären Kofaktor p300 sein, da er nach früheren Erkenntnissen von Smits *et al.* (1996) der Transformation der Zelle durch Ad-E1A entgegenwirkt.

2 Material

2.1 Chemikalien

Hier nicht gesondert aufgeführte Chemikalien (mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“) sowie nicht erwähnter allgemeiner Laborbedarf wurden in der erforderlichen Qualität im Fachhandel bezogen.

Acrylamid	BioRad, München
Agarose	FMC Bioproducts, Dänemark, über Biozym, Hameln
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bacto yeast extract	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Peptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
HEPES	Sigma, Deisenhofen
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
SDS	BioRad, München

Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefabloc	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PVP	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1 U/μl)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (TdT)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Desoxyribonuklease I (536 Kunitz U/mg)	Sigma, Deisenhofen
Klenow-Fragment der <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (2 U/μl)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Kollagenase/Dispase (Kollagenase > 0,1 U/mg/Dispase > 0,8 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
SUPER SCRIPT™ II RNaseH ⁻ Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Life Technologies, Eggenstein
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	Life Technologies, Eggenstein
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.3 Oligonukleotide

Name	Sequenz
5'-Ad12-E1Awt	5'-CGGGATCCTTGAGTGCCAGCGAGAAGAGTTTTCT-3'
3'-Ad12-E1Awt	5'-CGGGATCCTCAGGTGCTCAAAGTCCATTA-3'
5'-Ad12-9,5S-573	5'-CAACTTTTTTAACGAGCG-3'
5'-Ad12-10S-716	5'-AACTTTTTTAACGAGCTG-3'
3'-Ad12-10S-6	5'-CCGGAATTCCTAACTGAAACTCCTCA-3'
5'-Ad12-E1B	5'-TTTGGATCCATGGAGTTGGAAACTGTGCT-3'
3'-Ad12-E1B	5'-TTTGGATCCTCAAAAAGCGCAGCGTTGTT-3'
5'-pBabe-Intern	5'-GTCTTTTCACCTGGCCCCGC-3'
5'-9,5SEcoRI+	5'-GCGGAATTCAATGAGAACTGAAATGACT-3'
5'-MycBamHI	5'-GCGGGATCCATGGAGCAAAAGCTCATT-3'
3'-MycEcoRI	5'-GCGGAATTCGGAAGCTTCGAGAGGCCT-3'
3'-pCR3.1	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

2.4 Plasmide

pBabe-Neo, Hygro, Puro	Retrovirusvektoren mit jeweils unterschiedlichen Resistenzgenen, zur Verfügung gestellt von H. Land, Imperial Cancer Research Fund, London
pCR3.1	Eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen, Niederlande)
pRc/RSV	Eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen, Niederlande)
pRc/CMV	Eukaryontischer Expressionsvektor mit einem 6 x Myc-Epitop (Invitrogen, Niederlande)

2.5 Antikörper

Anti-Ad12 E1A-Antiserum (polyklonales Schaf-Antiserum)	zur Verfügung gestellt von Phil Gallimore, University of Birmingham, England
Anti-Ad12 E1B55K-Antiserum (polyklonales Kaninchen Antiserum)	zur Verfügung gestellt von Daiqing Liao, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec
Anti-Kaninchen IgG-AK Peroxidase-konjugiert	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Maus IgG-AK Peroxidase-konjugiert	Calbiochem, Heidelberg
Anti-Maus-MHC-H2-k ^d -AK FITC-konjugiert	PharMingen, Hamburg
Anti-myc-Epitop (9E10)-AK (monoklonaler Maus IgG-AK)	Invitrogen, Niederlande
Anti-p300-AK (N-15) (polyklonaler Kaninchen IgG-AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-p300-AK (C-20) (polyklonaler Kaninchen IgG-AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-PKA α cat (c-20) (Polyklonaler Kaninchen IgG-AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-Schaf IgG-AK Peroxidase- konjugiert	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
Normales Kaninchen IgG-Antiserum	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA

2.6 Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
6-Loch-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø Vertiefungen, Zellkulturplatten, -flaschen, -schalen	Becton Dickinson, New York, USA, über Oehmen, Essen
DMEM	Life Technologies, Eggenstein
DMEM ohne Methionin	Life Technologies, Eggenstein

Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Eggenstein PAA, Marburg
Fötales Kälberserum (FKS), dialysiert	PAA, Marburg
Geneticinsulfat (G 418)	PAA, Marburg
Hygromycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Penicillin G (1000 U/ml)	Hoechst, Frankfurt
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen

2.7 Radiochemikalien

TRAN ³⁵ S-Label ³⁵ S-Methionin spez. Aktivität: 43,5 TBq/mmol 1175 Ci/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
[α - ³² P]-dCTP spez. Aktivität: 111 TBq/mmol >3000 Ci/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege

2.8 Molekulargewichtstandards

λ -DNA-Größenstandard	Life Technologies, Eggenstein
100-bp DNA-Leiter	Life Technologies, Eggenstein
¹⁴ C-markierter SDS-PAGE Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-PAGE Standards (gefärbt)	BioRad, München Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.9 Kits und spezielle Reagenzien

Aprotinin (Rinderlunge, 4 TIU/mg)	Sigma, Deisenhofen
BioRad Bradford-Reagenz	BioRad, München
Eukaryotic TA Expression Kit	Invitrogen, Niederlande
Fluorograd	BioRad, München
Histoclear	Shandon, Frankfurt
Histomount	Shandon, Frankfurt
Kryo-Einbettmedium	Leica, Bensheim
Lipofectamine	Life Technologies, Eggenstein
Metafectene	Biontex, Martinsried
OPTI-MEM	Life Technologies, Eggenstein
Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit Nucleobond AX 500	Macherey & Nagel, Düren
Paraplast	Pelco International, Redding, Kanada
Proteasomeninhibitor, MG-132 (C ₂₆ H ₄₁ N ₃ O ₅)	Calbiochem, Heidelberg
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Ready To Go DNA Labelling Beads	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RNaseOUT (40 U/μl)	Life Technologies, Eggenstein
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rotihistol	Roth GmbH, Karlsruhe
Sephadex G-50-Säulen	Pharmacia Biotech, Freiburg
Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz- Detektionssysteme (für Western-Blot)	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
TRIZOL-Reagenz	Life Technologies, Eggenstein
TUNEL-Färbelösung	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.10 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

Hybond-C-plus Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Adhäsions-Objektträger	Histobond, Marienfeld
Hybond-N Nylon Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-A Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-A/G Sepharose	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, Rochester, USA
Rotiszint eco plus Szintillationsflüssigkeit	Roth GmbH, Karlsruhe
Sterivex-GS 0,22 µm Filter Unit	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, England

2.11 Spezielle Laborgeräte

DNA Trio Thermoblock (PCR)	Biometra, München
Fluorescent Activated Cell Sorter	Becton Dickinson, New York, USA
Gene Pulser Elektroporator	BioRad, München
Kryostat	Leica, Bensheim
Laser Densitometer Ultrascan XL	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mini-Protean-II-Cell	BioRad, München
Rotationsinkubator	Biometra, Göttingen
Szintillationsmessgerät Delta 300, Searle Analytic Incorporation	über Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Ultraschalldesintegrator	Branson, USA

2.12 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	29,2 g Acrylamid 0,8 g N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit H ₂ O ad 100 ml
Ampicillinlösung	50 mg/ml in H ₂ O
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardts Reagenz (100 x)	2% (w/v) BSA 2% (w/v) Ficoll 2% (w/v) PVP
DNA-Probenpuffer (6 x)	150 mM EDTA 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylenxylanol FF 30% (v/v) Glycerin
DNase Puffer	10 mM Tris/HCl 10 mM NaCl 5 mM MnCl ₂ 25 mM KCl
dNTP-Mix (für PCR)	je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in A. bidest
E1A-Lysepuffer	250 mM KCl 50 mM HEPES/KOH, pH 7,9 0,1% NP-40 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 mM Pefabloc 10 µg/ml Aprotinin
Eosin-Stammlösung	2,5 g Eosin 50 ml A. bidest. 200 ml 96% Ethanol

Formaldehydlösung, 4%	108 ml 37% Formalin 18,75 g NaH_2PO_4 4,2 g NaOH 18,6 ml 1N NaOH, mit H_2O auffüllen, pH 7,4 mit NaOH einstellen
Gelfärbelösung (SDS-PAGE)	450 ml H_2O 450 ml Methanol 100 ml Eisessig 2,5 g Coomassie Brilliant Blue
Gelfixierlösung (SDS-PAGE)	50% (v/v) 2-Propanol 7% (v/v) Essigsäure
IP+250-Puffer	50 mM HEPES/KOH pH 7,5 250 mM KCl 1 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM Na_3VO_4 0,1% (v/v) NP-40 0,5 mM Pefabloc 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin
Neutralisationslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2 1 mM Na_2EDTA
Paraformaldehydlösung	70% (v/v) PBS 4% (w/v) Paraformaldehyd 30 mM Galaktose pH 7,4 mit HCl einstellen
PBS	4 mM MgSO_4 7 mM CaCl_2 1,4 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na_2HPO_4
PBS^-	wie PBS, ohne MgSO_4 und CaCl_2
Permeabilisierungslösung	PBS 0,3% (v/v) Triton-100X 0,1% (w/v) Natriumzitat
Propidiumjodidlösung	5% Propidiumjodid (w/v) in H_2O

PS-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycinsulfat 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g Glucose 0,1 g NaHCO ₃ mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt
RT-Erststrangsynthese-Puffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂
SDS-PAGE-Laufpuffer (1 x)	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 2,550 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl pH 6,8 0,6 M DTT 12% (w/v) SDS 60% (v/v) Glycerin 0,6% (w/v) Bromphenolblau
SSC (20 x)	3,0 M NaCl 0,3 M Na ₃ -Citrat
TBS	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-T	TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
Transferpuffer (für Western- Blotting)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037% (w/v) SDS für Proteine < 180kDa oder 0,8% (w/v) SDS für Proteine > 180kDa 20% (v/v) Methanol
VT-Lösung	0,5 M EDTA 2,5 g/l Trypsin in PBS ⁼

2.13 Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyrA96*, *thi1* *relA1*] ist ein rekombinationsdefekter Bakterienstamm zur Vermehrung von Derivaten der pBR322-Plasmide (Life Technologies, Eggenstein).

2.14 Zelllinien

BMK-Zellen	Primäre Nierenzellen. isoliert aus 4-6 Tage alten BALB/c Mäusen
C33A-Zellen	Humane epitheloide Cervix-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
HEK-12-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch Transfektion des <i>EcoR</i> IC-Fragments von Ad12 (Whittaker <i>et al.</i> , 1984); zur Verfügung gestellt von P. Gallimore, University of Birmingham, UK
HeLa-tk ⁻ -Zellen	Humane epitheloide Cervix-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
KB-Zellen	Humane epidermale Rachen-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
Ω E-Zellen	Ecotrope Helfervirus-freie Verpackungszelllinie auf Basis der Maus-Fibroblastenzelllinie NIH3T3; zur Verfügung gestellt von H. Land, Imperial Cancer Research Fund, London, UK (Morgenstern und Land, 1990)
NIH-3T3-Zellen	Etablierte Maus-Fibroblastenzelllinie, ATCC, Rockville, USA

3 Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

Hier nicht gesondert aufgeführte molekularbiologische Arbeitstechniken wurden gemäß den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.* 1997) durchgeführt.

Das Arbeiten mit Säugerzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Lösungen und Materialien wurden bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten, wurden sterilfiltriert.

3.2 Zellkultur

Die transformierten BMK-Zelllinien (Ad12-E1Awt/m, Ad12-13Sw/m) sowie die Zelllinien HEK-12, HeLa-tk⁻, KB, NIH-3T3 und primäre BMK-Zellen wuchsen adhärent in beschichteten Zellkulturgefäßen bei 37°C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre. Als Nährmedium diente DMEM, versetzt mit 10% FKS, nicht essentiellen Aminosäuren, 1,5% einer 2 mM L-Glutaminlösung und jeweils 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin (im folgenden als DMEM-Vollmedium bezeichnet). Konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS⁼ gewaschen und durch Trypsinbehandlung von der beschichteten Fläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1 : 5 bis 1 : 15 in neue Zellkulturgefäße überführt.

Zur Lagerung von Zellen wurden diese in Einfriermedium (DMEM-Vollmedium mit 20% FKS und 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspensionen (ca. 5×10^6 Zellen/ml) wurden in mit Zellstoff isolierten Kryogefäßen bei -80°C schonend eingefroren und nach 12-24 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.1 Präparation primärer Mausnierenzellen

Zur Gewinnung primärer Mausnierenzellen (BMK-Zellen) wurden Nieren aus 4-6 Tage alten BALB/c-Mäusen unter sterilen Bedingungen entnommen und mittels steriler Scheren mechanisch zerkleinert. Bindegewebige Strukturen wurden nachfolgend durch enzymatische Behandlung (2 h, 37°C) mit einem Gemisch aus Kollagenase und Dispase (0,1 U/ml) in DMEM-Vollmedium ohne Serum unter Rühren zerstört und die ausgelösten Zellen in Zellkulturgefäßen kultiviert. Für die anschließenden Versuche wurden nur BMK-Zellen bis zur maximal zweiten Passage verwendet.

3.2.2 Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren

Zur Infektion humaner Zellen mit Adenoviren wurden zunächst hochkonzentrierte Virus-Stocklösungen (Ad12, Stamm Hui) hergestellt. Zu diesem Zweck wurden in großem Maßstab 70-90% konfluent gewachsene KB-Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen 2 h mit virushaltigem Medium (DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika und FKS = TM) inkubiert. Dieser Infektionsansatz wurde alle 30 min leicht geschwenkt. Anschließend wurde der infektiöse Überstand abgenommen und durch DMEM-Vollmedium ersetzt. Nachdem sich der überwiegende Teil der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst hatte, wurden die Zellen geerntet und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 x g und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in dem 5-fachen Zellvolumen TM resuspendiert und durch mehrmaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C lysiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (4000 x g, 4°C) und der Überstand zur Infektion humaner Kulturzellen verwendet. Dazu wurde der infektiöse Überstand in TM so verdünnt, dass ein Virustiter, der zur Infektion von 70-80% der Zellen ausreichte, erzielt wurde, und die 70-90% konfluent gewachsenen Zellen wie oben beschrieben infiziert.

3.2.3 Transfektion von Eukaryontenzellen durch Lipofektion

Die Transfektion von Eukaryontenzellen erfolgte unter Verwendung der liposomalen Transfektionsreagenzien Lipofectamine oder Metafectene gemäß den Angaben der Hersteller. 18-24 h vor Transfektionsbeginn wurden 1,5 bis 2,5 x 10⁵ Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (ca. 7 cm² Wachstumsfläche) in Abhängigkeit von dem verwendeten Transfektionsreagenz in

DMEM-Vollmedium bzw. DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika ausgesät. Die Zellen wurden 5 bis 6 h mit dem Transfektionsansatz, bestehend aus DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika und den DNA-Lipidkomplexen, inkubiert. Durch Austausch des Transfektionsansatzes mit DMEM-Vollmedium wurde die Transfektion anschließend gestoppt.

3.2.4 Herstellung stabiler Zelllinien

Zur Etablierung von Zelllinien, die ein eingefügtes Transgen stabil exprimieren, wurde das Vektorkonstrukt pBabe-9,5S/6 x Myc mittels Lipofektion in Ad12-E1Am-Zellen transduziert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion passagiert, unterschiedliche Verdünnungen der Zellsuspension auf 150 mm Ø Zellkulturschalen überführt und unter Selektionsdruck (2-5 µg/ml Puromycin in DMEM-Vollmedium) kultiviert. Nach ca. 2 Wochen wurden Zellfoci mit einem Durchmesser von 2-3 mm mit Hilfe von Klonierungsringen isoliert, durch Trypsinbehandlung abgelöst und in 24-Loch-Zellkulturgefäße überführt. Die so gewonnenen Zelllinien wurden durch Western-Blotting auf die Expression des Transgens hin untersucht.

3.2.5 Kultivierung von Zellen in Weichagar (Lindl und Bauer, 1994)

Zur Bestimmung der Wachstumsrate von Zelllinien unabhängig von Anheftungsflächen wurden diese in halbfestem Medium in 6-Loch-Platten kultiviert. Dazu wurden die Zellen in DMEM-Vollmedium/0,3% Agar auf einer Basalschicht, bestehend aus DMEM-Vollmedium/0,6% Agar, die ein Anheften einzelner Zellen an das Kulturgefäß verhindert, ausgesät. Zur Herstellung der Basalschicht wurde eine 42°C warme 1,2%ige Agarlösung (w/v) im Verhältnis 1 : 1 mit 37°C warmem, zweifach konzentriertem DMEM-Vollmedium gemischt und davon 1 ml in eine Vertiefung der 6-Loch-Platte gegossen. Nach dem Erkalten der Basalschicht wurden 1×10^4 Zellen in 0,5 ml 2 x DMEM-Vollmedium mit 0,5 ml einer 42°C warmen 0,6%igen Agarlösung vermischt und auf die Basalschicht gegeben. Nach dem Erstarren der Zellsuspension bei Raumtemperatur wurden die Zellen unter Zellkulturbedingungen (siehe 3.2) gehalten.

Nach ca. 3 Wochen wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dabei wurden nur Zellklone berücksichtigt, die eine Größe von mindestens 0,5 mm Ø aufwiesen.

3.3 Tierversuche

Für die Tierversuche lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Düsseldorf gemäß §8 Abs. 1 des TShG (G516/99) vor.

3.3.1 Haltungsbedingungen

Die verwendeten Nacktmäuse (Stamm NMRI^{nu/nu}) stammten aus der Zucht der Nagerabteilung des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen und wurden während der Versuche unter halbsterilen Bedingungen gehalten. Die immunkompetenten Mäuse (Stamm BALB/c) wurden von Harlan-Winkelmann bezogen und unter offenen Standardbedingungen gehalten. Alle Tiere waren einem täglichen Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 h : 12 h ausgesetzt. Standard Futter und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.3.2 Tumorinduktionsversuche

Die in den Tumorinduktionsversuchen eingesetzten Nacktmäuse waren 4-8 Wochen alt, die BALB/c-Mäuse nicht älter als 6 Wochen. Allen Tieren wurden pro Versuch 1×10^7 oder 5×10^7 Zellen, resuspendiert in 200-300 µl PBS, mit Hilfe einer 0,3 ml Insulinspritze im Bereich der Flanke subkutan injiziert. Dabei wurde sichergestellt, dass die Zellen frei von Kontaminationen, z. B. durch Mycoplasmen, waren. Die Größe entstandener Tumoren wurde täglich in zwei Ebenen mit einer Schieblehre oder alternativ durch Magnetresonanztomographie bestimmt. Solange die Tumoren die Bewegungsfreiheit der Tiere nicht einschränkten, wurden sie bis zu einer Größe von 2 cm wachsen gelassen. Tiere mit größeren Tumoren wurden getötet. Die Berechnung des Tumorumfanges erfolgte nach der Formel $V_{\text{Tumor}} = (a \times b^2)/2$ (mit $a > b$) (Sanchez *et al.*, 1994).

3.3.3 Rekultivierung von Tumorzellen

Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet und der komplette Tumor unter sterilen Bedingungen entnommen. Das Tumorgewebe wurde entsprechend der Vorgehensweise bei der Gewinnung primärer Mausnierenzellen (siehe 3.2.1) mechanisch und enzymatisch behandelt und die präparierten Zellen unter Zellkulturbedingungen (siehe 3.2) kultiviert.

3.4 Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung PCR-amplifizierter oder restringierter DNA sowie die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction-Kits“ (Qiagen). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im quantitativen Maßstab erfolgte unter Verwendung des „Plasmid-DNA-Maxipräparationskits Nucleobond AX 500“ (Macherey & Nagel). DNA-Sequenzierungen wurden von der Sequenzierfirma Seqlab GmbH (Göttingen) durchgeführt.

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis *et al*, 1986)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur sequenzspezifischen Amplifikation distinkter DNA-Sequenzen unter Verwendung synthetisch hergestellter Oligonukleotide (Primer). Diese Methode wurde zum Nachweis der Integration von DNA-Sequenzen in das Genom von Säugerzellen, zur Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone, zum Nachweis durch RT-PCR generierter cDNAs und zur Klonierung von DNA-Sequenzen angewendet.

3.4.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Der Nachweis spezifischer mRNAs in Gesamt-RNA aus Säugerzellen erfolgte mittels RT-PCR. Die Erststrangsynthese erfolgte unter Verwendung des RT-PCR-Kits der Firma Invitrogen. Ein Ansatz, bestehend aus 1-5 µg Gesamt-RNA und 2 pmol eines spezifischen 3'-Primers, wurde mit DEPC-behandeltem Wasser (im Kit enthalten) auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis schockgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl RT-Erststrangpuffer, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und

2 µl 0,1 M DTT wurde der Ansatz 2 min bei 42°C inkubiert. Die Synthese des cDNA-Stranges erfolgte nach Zugabe von 1 µl (200 U) Reverse-Transkriptase mit nachfolgender Inkubation für 50 min bei 42°C. Die Reverse-Transkriptase wurde anschließend durch 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

Die weitere Analyse der generierten cDNA erfolgte durch PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

3.4.3 Southern-Blotting (Southern, 1975)

Zum Nachweis der Integration von Ad12-E1A- bzw. Ad12-E1B-Sequenzen in das Genom der transformierten Mauszelllinien wurden Southern-Blot Analysen durchgeführt. Aus $0,5-1 \times 10^7$ Zellen wurde unter Verwendung des „QIAamp Tissue-Kits“ genomische DNA isoliert. Anschließend wurden jeweils gleiche Mengen (40 µg) DNA jeder Zelllinie mit 100 U der Restriktionsendonuklease *Bgl* II über einen Zeitraum von mindestens 4 h vollständig restringiert und die erhaltenen Fragmente über 1%ige Agarosegele bei ca. $10\text{V}/\text{cm}^2$ aufgetrennt. Durch Inkubation der Gele in 0,25 M HCl wurden hochmolekulare DNA-Fragmente lysiert und damit der Transfer von DNA Fragmenten > 10 kDa gewährleistet. Anschließend wurde die DNA durch Behandlung mit Denaturierungslösung (3 x 15 min) in Einzelstrang-DNA überführt. Nach Inkubation in Neutralisationslösung (3 x 30 min) wurde die DNA mit Hilfe der Kapillar-Blot Methode mittels 20 x SSC als Transferpuffer auf eine Nylonmembran transferiert. Die Quervernetzung der DNA mit der Membran erfolgte durch 5-minütige UV-Bestrahlung (302 nm) der getrockneten Membran auf einem Standard-Transilluminator.

3.4.4 Hybridisierung von DNA

Die Detektion von Zielsequenzen in der Zell-DNA erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden. Die Sonden-DNA wurde durch Restriktion der Konstrukte pBabe-Neo-Ad12-E1A bzw. pBabe-Hygro-Ad12-E1B und anschließender Agarosegelaufreinigung der spezifischen Fragmente gewonnen. Die radioaktive Markierung mit $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP erfolgte unter Verwendung der „Ready To Go DNA Labelling Beads“ nach den Angaben des Herstellers. Nicht eingebaute Radionukleotide

wurden durch Säulenchromatographie über Sephadex-G50-Säulen abgetrennt. Die spezifische Aktivität der so gewonnenen Sonden-DNA lag zwischen 1×10^7 und 1×10^8 cpm/ μ g DNA.

Nach einstündiger Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung bei 65°C wurde die Membran 12-16 h bei 65°C in Hybridisierungslösung, die denaturierte Sonden-DNA mit einer spezifischen Aktivität von $1-2 \times 10^6$ cpm/ml enthielt, inkubiert. Darauf folgten mehrere Waschschrte (2 x 15 min, 2 x SSC; 1 x 30 min, 2 x SSC/0,1% SDS; 1 x 10 min, 0,1 x SSC) bei 65°C. Anschließend wurde die feuchte Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen und die gebundene Radioaktivität durch Exposition gegen BioMax-Röntgenfilm detektiert.

Um Southern Blots für weitere Hybridisierungen verwenden zu können, wurde die zuvor gebundene Sonde entfernt. Zu diesem Zweck wurde die Membran jeweils für 30 min bei 45°C in 0,4 M NaOH und anschließend in 0,1 x SSC, 0,1% SDS, 0,2% Tris/HCl (pH 7,5) unter Schütteln inkubiert.

3.5 Analyse von Proteinen

3.5.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Kulturzellen wurden subkonfluent gewachsene Zellen mit 4°C kaltem PBS⁻ gewaschen und durch Abschaben geerntet. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation bei 1500 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspendieren in E1A-Lysepuffer und Schütteln für 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 52000 x g und 4°C 30 min pelletiert und der klare Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bradford Reagenz.

3.5.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Tumorgewebe

Das Tumorgewebe wurde nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurde das Gewebe in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zu einem homogenen Pulver

verarbeitet. Das Gewebepulver wurde in das 5-fache Volumen des E1A-Lysepuffers aufgenommen und in einem Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert. Das Lysat wurde anschließend 5 s beschallt und 30 min bei 4°C geschüttelt. Nicht lösliche Gewebereste wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 52000 x g sedimentiert und der Proteinextrakt als klarer Überstand abgenommen.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970). Die Trenngele (im Bereich von 6-18%, C-Wert: 2,7%) und Sammelgele (5%, C-Wert: 2,7%) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x SDS-Probenpuffer) vermischt und 5 min gekocht. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Kammer.

3.5.4 Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen in Extrakten aus Kulturzellen oder aus Tumorgewebe wurden die Extrakte durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 3.5.3) und durch Elektroblothing (Semi-Dry-Blot-Apparatur, 1–2 h, 1,7 mA/cm²) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond C+) transferiert. Die Membran wurde vor dem Blotten durch kurzes Waschen in H₂O und einer nachfolgenden zehnminütigen Äquilibration in Transferpuffer (siehe Abschnitt 2.12) aktiviert. Der Transfer von Proteinen bis 180 kDa erfolgte für 1 h in Transferpuffer mit 0,037% SDS und für Proteine über 180 kDa für 2 h in Transferpuffer mit 0,8% SDS. Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h mit 1 x TBS-T/10% Milchpulver unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur blockiert und anschließend in derselben Lösung für 1-12 h mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1 : 250 bis 1 : 5000 je nach Antikörper) inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, der gegen den F_c-Anteil des Primär-Antikörpers gerichtet ist, für 1 h in TBS-T/1% Milchpulver (Verdünnung 1 : 2000 bis 1 : 150000 nach Angabe des Herstellers) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (3 x 10 min TBS-T, 2 x 5 min TBS) erfolgte die

Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe durch das Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz-Detektionssystem gemäß den Angaben des Herstellers.

Sollte die Membran anschließend weiteren Antikörperreaktionen unterzogen werden, wurden die bestehenden Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in TBS-0,2% Tween-20 für 45 min bei 70 °C unter leichtem Schütteln dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und einer erneuten Antikörperreaktion unterzogen.

3.5.5 Bestimmung der Halbwertszeit zellulärer Proteine durch Pulse-Chase-Untersuchungen

Die Bestimmung der Halbwertszeit zellulärer Proteine erfolgte durch Pulse-Chase-Untersuchungen. $1,5-2 \times 10^6$ Zellen der zu untersuchenden Zelllinie wurden auf 6 cm Ø Zellkulturschalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 1 h in DMEM ohne Methionin mit 10% dialysiertem FKS kultiviert, dann 1 h in dem gleichen Medium mit zusätzlich $11,1 \times 10^6$ Bq/ml ^{35}S -Methionin Puls-markiert und anschließend in DMEM-Vollmedium kultiviert. Die Zellkulturen wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Markierung wie unter Punkt **3.5.1** geerntet und in IP+250-Puffer lysiert. Aus jeweils gleichen Mengen Zellextrakt (250-500 µg) wurden die Proteine, deren Halbwertszeit bestimmt werden sollte, wie unter Punkt **3.5.6** beschrieben, mit den entsprechenden Antikörpern präzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert.

3.5.6 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden Zellen wie unter Abschnitt **3.5.1** beschrieben geerntet, in IP+250-Puffer resuspendiert und 30 min bei 4°C geschüttelt. Das Lysat wurde danach 30 min bei 52000 x g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des klaren Überstands nach Bradford bestimmt.

Die für die Präzipitation verwendete Protein-A-Sepharose (30-60 µl pro Ansatz) wurde zunächst 3 x in IP+250-Puffer unter Schütteln äquilibriert. Zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine (Preclearing) wurde der Zellextrakt in einem Gesamtvolumen von 250-500 µl zusammen mit 1-2 µg eines unspezifischen Antikörpers (normal rabbit IgG) ebenfalls unter Schütteln über einen Zeitraum von 30 min bis 2 h inkubiert. Anschließend wurde die

Sepharose bei 600 x g pelletiert und das Proteinextrakt-Antikörpergemisch zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 4°C geschüttelt, anschließend bei 4°C und 600 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach dem Preclearing wurde dem Überstand ein spezifischer Antikörper (1-2 µg) zugegeben und dieser Ansatz 3 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 30-60 µl äquilibrierter Sepharose wurde dieser Ansatz unter Schütteln weitere 12 bis 16 h bei 4°C inkubiert. Die an den Proteinanteil der Sepharose gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anschließend abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4°C) und dreimal mit jeweils 1 ml IP+250-Puffer gewaschen. Die Sepharose mit den Proteinkomplexen wurde anschließend 5 min in 1 x Laemmli-Puffer gekocht und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Nach dem Gellauf wurden nicht radioaktiv markierte Proteine durch Western-Blotting nachgewiesen. Gele mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markierten Proteinen (siehe auch **3.5.5**) wurden nach Beendigung des Gellaufes 30 min in Gelfixierlösung fixiert, 30 min in einer Verstärkerlösung (Amplify) inkubiert und unter Vakuum bei 60°C getrocknet. Zur Detektion der markierten Proteine wurden die getrockneten Gele bei -80°C gegen Röntgenfilme exponiert.

3.5.7 FACS-Analysen

Die Quantifizierung bestimmter Oberflächenproteine von Säugerzellen erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS-Analysen) mit einem FACS-Gerät der Firma Becton-Dickinson. Die zu untersuchenden Zellen wurden durch schonendes Trypsinieren geerntet und durch mehrmaliges Pipettieren sorgfältig vereinzelt. Anschließend wurden 1×10^5 - 1×10^6 Zellen 20 min in 1 ml PBS/0,1% FKS mit 1 µg eines monoklonalen FITC-konjugierten Antikörpers (Maus H2-k^d, PharMingen) bei 4°C inkubiert. Die Antigen-Antikörperreaktion wurde durch Zugabe von 5 ml PBS mit nachfolgender Zentrifugation (390 x g, 5 min) abgestoppt. Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und die Oberflächenfluoreszenz durch Analyse von 2×10^4 Zellen pro Zelllinie im FACS-Gerät bestimmt. Abgestorbene Zellen wurden durch 3-minütige Behandlung der Zellsuspension mit Propidiumjodid (5 µg/ml Endkonzentration) direkt vor der Messung im PI-Kanal identifiziert. Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit dem Analyseprogramm Cell-Quest.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Herstellung von Kryo-Gewebeschnitten

Für die histologische Untersuchung von Tumorgewebe sowie für die Verwendung in TUNEL-Studien wurden Kryo-Gefrierschnitte der zu untersuchenden Tumoren hergestellt. Dazu wurden frisch entnommene Tumoren in Kryo-Einbettmedium mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe eines Kryostaten Schnitte von 0,5 µm Dicke hergestellt. Diese wurden auf Adhäsions-Objektträger übertragen und ca. 2 h luftgetrocknet. Zur Fixierung der Schnitte wurden diese anschließend 10 min bei Raumtemperatur in Paraformaldehydlösung inkubiert.

3.6.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Zur Herstellung HE-gefärbter Schnittpräparate von Tumoren wurden Paraffinschnitte hergestellt. Das frisch entnommene Gewebe wurde über Nacht in 4%iger Formalinlösung fixiert und anschließend nach folgendem Programm maschinell in Paraffin eingebettet. Dabei erfolgten alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsgänge unter Vakuum. Nach erneuter Fixierung in 4% Formalin (45 min, 30°C) wurden das Tumormaterial in Ethanol unterschiedlicher Konzentration über die angegebenen Zeiträume bei 30°C dehydriert (70% Ethanol, 45 min; 80% Ethanol, 45 min; 96% Ethanol, 60 min; 100% Ethanol, 60 min; 100% Ethanol, 60 min). Es folgten drei Inkubationen in Rotihistol bei 30°C. Die abschließende Einbettung in Paraplast erfolgte in drei Schritten bei 59°C (Paraplast I, 60 min; Paraplast II, 60 min; Paraplast III, 75 min).

3.6.3 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung von Kryo- und Paraffingewebeschnitten

Zur lichtmikroskopischen Darstellung von Tumorschnitten und zur Differenzierung der Zellkerne von zytoplasmatischen Strukturen wurden Dünnschnitte des zu untersuchenden Tumors mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Für die Färbung von Kryogewebeschnitten wurde Eosin-Stammlösung 1 : 4 mit 80%igem Ethanol verdünnt und Eisessig bis zum Auftreten einer Opaleszenz zugegeben. Die fixierten Dünnschnitte wurden zuerst 7 min in Hämatoxylin

inkubiert und anschließend 15 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Schnittpräparate 30 s in Eosinlösung inkubiert und zweimal kurz in 96%igem Ethanol dehydriert. Es folgten Inkubationen in aufsteigenden Isopropanolkonzentrationen über die angegebenen Zeiträume (60% 1 s, 80% 1 min, 99% 3 min). Abschließend wurden die Präparate zweimal 5 min in Histoclear inkubiert und in Histomount eingedeckt. Die Paraffinschnitte mussten vor der Färbung entparaffiniert werden. Dazu wurden die Schnitte jeweils 5 min in 96%igem und 70%igem Isopropanol inkubiert und anschließend 5 min in H₂O gewässert.

3.6.4 Detektion apoptotischer Zellen in Gefrierschnitten durch TUNEL-Assays (Wijsman *et al.*, 1993)

Die fixierten Präparate wurden zweimal 1 s und einmal 5 min in PBS gewaschen und anschließend zur Blockierung endogener Peroxydasen in PBS/0,6% H₂O₂ inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal 5 s in PBS gewaschen, sofort mit Permeabilisierungslösung behandelt und wie zuvor in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in 50 µl TUNEL-Reaktionslösung (5µl TdT, 45 µl TUNEL-Färbelösung) unter Licht- und Luftabschluss 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte wie oben erneut unter Lichtabschluss in PBS gewaschen und in Fluorograd eingedeckt.

Schnitte, die als Positivkontrolle dienten, wurden vor der TUNEL-Reaktion 10 min mit einer 0,1 µg/ml DNase-Lösung (entspricht einer Aktivität von ca. 0,054 K-Units) unter Lichtabschluss bei 37°C in 1 x DNase-Puffer behandelt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die nur mit TUNEL-Färbelösung ohne TdT behandelt worden waren.

4 Ergebnisse

Die E1A-Region von Ad12 ist verantwortlich für den onkogenen Phänotyp Ad12-E1A/E1B-transformierter Zellen (Bernards *et al.*, 1983). Zu Beginn meiner Untersuchungen waren bereits putative onkogene Determinanten der Ad12-E1A-Region, wie z. B. der Spacer oder das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein, beschrieben. Genauere Analysen der Beteiligung bestimmter Ad12-E1A-Genprodukte an der Onkogenität von Ad12 lagen jedoch nicht vor (siehe Einleitung). Die Untersuchung der Funktionen distinkter Ad12-E1A-Proteine im Prozess der onkogenen Transformation wurde mit Hilfe von Zelllinien vorgenommen, die unterschiedliche Ad12-E1A-Konstrukte sowie die Ad12-E1B-Region exprimieren. Da Ad-E1A-Proteine ihre Funktionen in der Zelle über Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Proteinen ausüben, sollte zudem die Wechselwirkung von Ad12-E1A mit dem zellulären Kofaktor p300 in diesen Zellen untersucht werden. Der Kofaktor p300 wurde ausgewählt, da er eine Schlüsselposition z. B. bei der Zellzyklusregulation, der Differenzierung oder der Apoptose einnimmt, tumorsupprimierende Eigenschaften aufweist (als Übersicht siehe Goodman und Smolik, 2000) sowie bei Überexpression der zellulären Transformation durch Ad5-E1 entgegenwirkt (Smits *et al.*, 1996).

4.1 Molekulare Charakterisierung Ad12-E1A/E1B-transformierter Mauszelllinien

Für die Untersuchung der Funktionen distinkter Ad12-E1A-Proteine bei der onkogenen Transformation wurden zwei Arten von Zelllinien generiert. Die Ad12-E1Awt-Zelllinien sind durch die Genprodukte der Ad12-E1A-Wildtypregion (Ad12-E1Awt), die Ad12-E1Am-Zelllinien durch die Genprodukte einer Ad12-E1A-Mutantenregion (Ad12-E1Am) jeweils in Kooperation mit Ad12-E1B transformiert. Das Ad12-E1Am-Konstrukt trägt eine Punktmutation im Spleißdonor für die Ad12-E1A_{11S}-, Ad12-E1A_{10S}- und Ad12-E1A_{9,5S}-mRNA. Diese Punktmutante sollte daher ausschließlich das Ad12-E1Am_{13S}- und das Ad12-E1Am_{12S}-Protein generieren können. Die Ad12-E1Awt-Region kodiert hingegen für alle Ad12-E1A-Proteine (siehe **Abb. 2**). Die Transduktion der adenoviralen Konstrukte in primäre BMK-Zellen erfolgte durch retroviralen Gentransfer (**Abb. 5**). Die Integration der rekombinanten Retroviren in die Zell-DNA wird durch die retroviralen LTRs vermittelt.

Mit Hilfe der etablierten Zelllinien sollte anhand von *in vivo* Onkogenitätsstudien untersucht werden, ob die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} der E1A-Region von Ad12 für die Onkogenität dieses Ad-Serotyps mitverantwortlich sind. Grundvoraussetzung für die Onkogenitätsstudien war die umfassende *in vitro* Charakterisierung der etablierten Zelllinien. Dabei sollten die Zelllinien hinsichtlich (I) der Art der Integration (genomisch oder als cDNA) der Ad12-E1A- und Ad12-E1B-Konstrukte, (II) der prozessierten mRNAs durch das entsprechende Ad12-E1A-Konstrukt, (III) des Integrationsmusters der Proviren im Zellgenom und (IV) der Expression beider Transgene untersucht werden. Weitere Studien sollten zudem Auskunft über den transformierten Status der stabilen Zelllinien sowie die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche geben.

4.1.1 Analyse der Ad12-E1Awt/E1Am-Zelllinien auf Integration der genomischen Ad12-E1A-Region oder entsprechender Ad12-E1A-cDNAs

Die stabile Integration der verwendeten Transgene in das Genom primärer BMK-Zellen erfolgte mit Hilfe der pBabe-Retrovirusvektoren. Die pBabe-Vektoren basieren auf dem Moloney Murine Leukemia Virus (Mo MuLV) und wurden von Morgenstern und Land (1990) entwickelt (siehe **Abb. 5**). Da ihnen die Mo MuLV-Gene *gag*, *pol* und *env* fehlen, wird für die Produktion infektiöser Virionen die entsprechende ecotrope Helferzelllinie Ω E benötigt (Morgenstern und Land 1990). Die Ω E-Zelllinie komplementiert die fehlenden Retrovirus-Gene, ihr fehlt jedoch ein funktionelles Verpackungssignal (ψ), weshalb sie ihre eigene genomische RNA nicht verpacken kann. Durch Transfektion der rekombinanten Retrovirusvektoren in die Helferzelllinie Ω E können sog. Produzentenzelllinien generiert werden. Da die pBabe-Vektoren eine intakte ψ -Sequenz tragen, geben die Produzentenzellen infektiöse Partikel in den Zellüberstand ab. Um infektiöse rekombinante Retroviren zu erhalten, welche die Ad12-E1-Konstrukte stabil in den Zielzellen exprimieren, wurden die adenoviralen Konstrukte Ad12-E1Awt und Ad12-E1Am in den Retrovirusvektor pBabe-Neo und Ad12-E1B in den Retrovirusvektor pBabe-Hygro kloniert (siehe **Abb. 5**). Durch Transfektion der Vektoren in Zellen der Helferzelllinie wurden anschließend Produzentenzelllinien generiert, die in den Zell-Überstand infektiöse rekombinante Retroviren abgeben. Der Überstand wurde anschließend für die Infektion primärer BMK-Zellen verwendet.

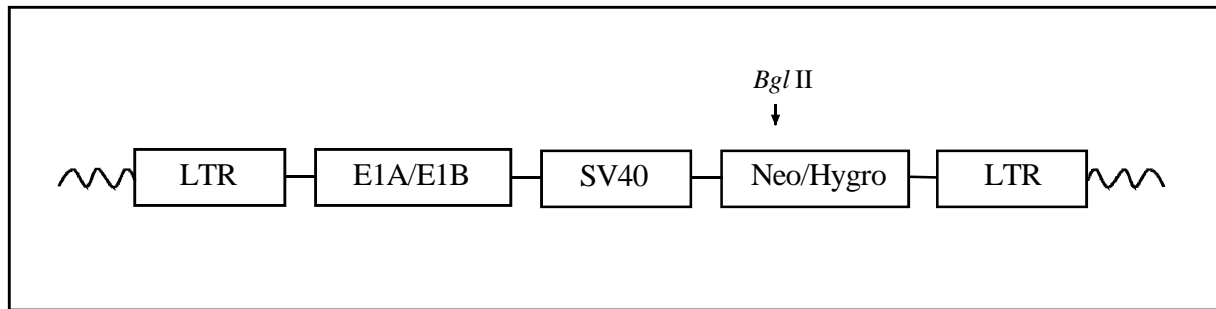


Abb. 5 Schematische Darstellung der pBabe Retrovirusvektoren (Morgenstern und Land, 1990). Die Expression der Transgene Ad12-E1A und Ad12-E1B (E1A/E1B) wird durch die Enhancersequenzen der retroviralen „Long Terminal Repeats“ (LTR) gesteuert. Die Expression der unterschiedlichen Resistenzgene gegen Geneticinsulfat (G418, Neo) und Hygromycin (Hygro) unterliegt der Kontrolle des minimalen Promotors des *simian virus* 40 (SV40). Beide Resistenzgene tragen eine singuläre Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bgl* II. Die geschlängelten Linien repräsentieren das zelluläre Genom, in das das Provirus integriert ist.

Zusätzlich zu den genomischen mRNAs können Produzentenzelllinien retroviraler Systeme jedoch auch Spleißprodukte der transduzierten Gene in infektiöse Partikel verpacken (siehe z. B. Cepco *et al.* 1984). Unter den durch Infektion von BMK-Zellen etablierten Zelllinien können demnach auch solche auftreten, die z. B. eine Ad12-E1A_{13S}-cDNA anstelle der genomischen Ad12-E1A-Region integriert haben. Die Fragestellung, ob die Proteine Ad12-E1A_{9,5S} und Ad12-E1A_{10S/11S} für die Onkogenität von Ad12 von Bedeutung sind, kann jedoch nur beantwortet werden, wenn von den transferierten Transkriptionseinheiten alle erwarteten Proteine generiert werden. Es ist somit sicherzustellen, dass in den Zelllinien die Integration eines genomischen Konstrukts vorliegt. Dies wurde durch PCR-Analysen zellulärer genomischer DNA mit den Primern 5'-Ad12-E1Awt und 3'-Ad12-E1Awt (für die Ad12-E1A-Konstrukte) sowie 5'-Ad12-E1B und 3'-Ad12-E1B (für das Ad12-E1B-Konstrukt) untersucht. Um den sicheren Nachweis zu führen, dass die Integration eines genomischen Konstrukts vorliegt, erfolgte im Fall der E1A-Sequenzen nach den PCR-Analysen zusätzlich ein Restriktionsverdau der PCR-Produkte. Restriktion der PCR-Produkte mit *Sca* I liefert für das genomische Konstrukt zwei Banden einer Größe von 565 bp und 394 bp und im Fall einer Ad12-E1A_{13S}-Integration Fragmente mit je 565 bp und 319 bp. Das Ad12-E1A_{12S}-Konstrukt wird durch *Sca* I nicht geschnitten (siehe **Abb. 6**, Spur 2).

In **Abb. 6** ist eine repräsentative PCR-Analyse einiger Ad12-13Sm- und Ad12-E1Am-Zelllinien dargestellt. Die Spuren 7-18 zeigen die Analyse der genomischen DNA der Ad12-E1Am_{13S}-transformierten Zelllinien Ad12-13Sm2 (Spur 7 und 8) und Ad12-13Sm3 (Spur 9 und 10) sowie der Zelllinien Ad12-E1Am3 (Spur 11 und 12), Ad12-E1Am1 (Spur 13 und 14), Ad12-E1Am4 (Spur 15 und 16) und Ad12-E1Am2 (Spur 17 und 18), die eine genomische

Ad12-E1Am-Integration tragen. Als Kontrollen dienten PCR-Produkte von Plasmid-DNA der Ad12-E1A_{12S}-cDNA (Spur 1 und 2), der Ad12-E1A_{13S}-cDNA (Spur 3 und 4) und der genomischen Ad12-E1A-Region (Spur 5 und 6). Durch die PCR-Untersuchungen wurden ausschließlich Integrationen einer genomischen Ad12-E1A-Region oder einer Ad12-E1A_{13S}-cDNA identifiziert. Die Integration einer Ad12-E1A_{12S}-cDNA konnte in keiner der insgesamt 31 untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

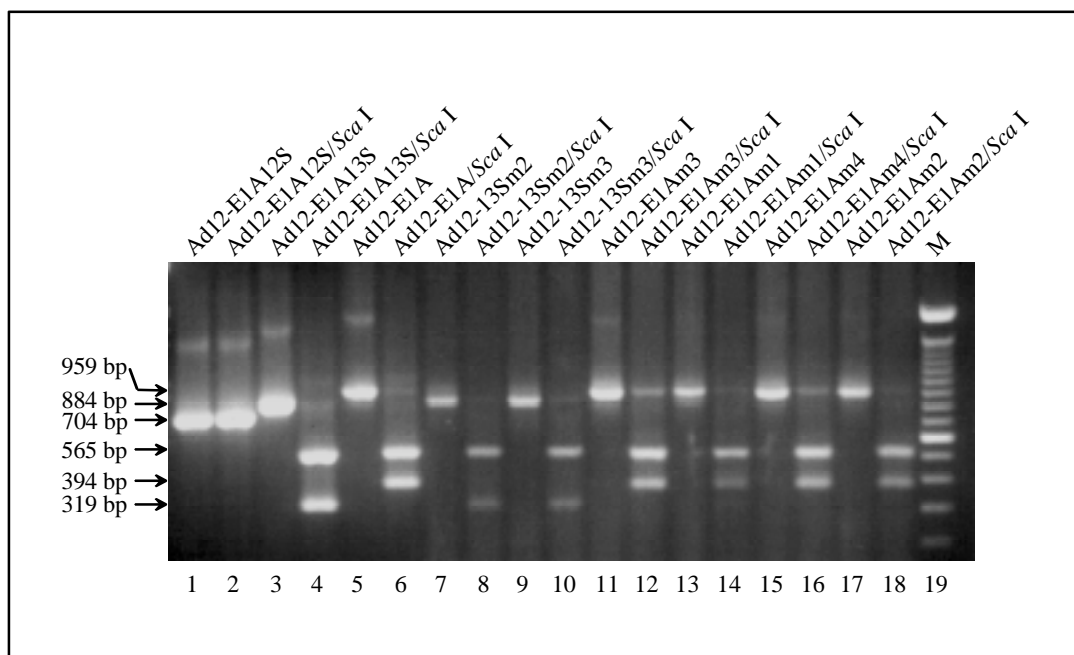


Abb. 6 Untersuchung der transformierten BMK-Zellen auf die Integration eines genomischen Ad12-E1A-Konstrukts oder einer Ad12-E1A-cDNA in das Zell-Genom. 3 µg genomische DNA wurden in einer Standard-PCR (50 Zyklen) mit den Primern 5'-Ad12-E1Awt und 3'-Ad12-E1Awt analysiert. Die PCR-Produkte wurden sowohl unbehandelt als auch restringiert mit der Restriktionsendonuklease *Sca I* durch Agarose-Gelelektrophorese in Ethidiumbromid gefärbten Gelen analysiert. Die Abbildung zeigt repräsentativ die Untersuchung von Ad12-13Sm- (Spuren 7-10) und Ad12-E1Am-Zelllinien (Spuren 11-18). Die Größen der aufgetretenen Fragmente sind links neben der Abbildung angegeben. Als Kontrollen wurden die Ad12-E1A_{12S}-cDNA (Spuren 1 und 2), die Ad12-E1A_{13S}-cDNA (Spuren 3 und 4) sowie die genomische Ad12-E1A-Region (Spuren 5 und 6) in die PCR-Reaktion eingesetzt. M: Größenstandard (Spur 19).

4.1.2 Nur die Zelllinien, die das Ad12-E1Awt-Konstrukt integriert haben, können die mRNAs für die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} prozessieren

Die Punktmutation an nt 589 im Ad12-E1Am-Konstrukt zerstört den ersten Spleißdonor der mRNAs, von denen die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und des Ad12-E1A_{9,5S} translatiert werden (siehe **Abb. 4**). Es ist daher zu erwarten, dass die Ad12-E1Am-Zelllinien lediglich die

Proteine Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} generieren. Die Ad12-E1Awt-Zelllinien sollten dagegen alle Ad12-E1A-spezifischen mRNAs prozessieren können. Um dies zu überprüfen, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Erststrangsynthese erfolgte unter Verwendung des Ad12-E1A-spezifischen 3'-Primers (3'-Ad12-E1Awt). Die mRNAs für die Proteine Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} wurden mit den Ad12-E1Awt-Primern (5'-Ad12-E1Awt, 3'-Ad12-E1Awt: E1A_g), die Ad12-E1A_{10S}- und die Ad12-E1A_{9,5S}-mRNAs wurden jeweils mit spezifischen Primern (5'-Ad12-10S-716, 3'-Ad12-10S-6: E1A_{10S}; 5'-Ad12-9,5S-573, 3'-Ad12-E1Awt: E1A_{9,5S}) amplifiziert.

In **Abb. 7** sind die Ergebnisse repräsentativer Analysen zellulärer Gesamt-RNA einer Ad12-E1Awt- und einer Ad12-E1Am-Zelllinie dargestellt. Die Spuren 4 von **Abb. 7 A** und **7 B** zeigen die RT-PCR-Analyse der zellulären mRNA mit den Primern 5'-Ad12-E1Awt und 3'-Ad12-E1Awt (E1A_g), welche die dominanten cDNAs Ad12-E1A_{13S} und die Ad12-E1A_{12S} amplifizieren. In den Spuren 6 sind die gleichen Untersuchungen mit Primern, die spezifisch die Ad12-E1A_{10S}-mRNA detektieren, dargestellt und die Spuren 8 zeigen PCR-Analysen mit Ad12-E1A_{9,5S}-spezifischen Primern. In den Spuren 1, 2, 3, 5 und 7 sind Kontrollversuche mit cDNAs der jeweiligen RNA-Spezies zu sehen.

Die RT-PCR-Untersuchungen zeigen, dass das Ad12-E1Awt-Konstrukt alle erwarteten mRNAs prozessiert. Die Analyse der mRNA der Ad12-E1Am-Zelllinie mit Ad12-E1A_{9,5S}-spezifischen Primern (Spur 8) lieferte kein Produkt. Gleiche Untersuchungen mit Ad12-E1A_{10S/11S}-spezifischen Primern lieferten ein nicht erwartetes Produkt einer Größe von 332 bp. Da bei einer korrekten Amplifikation der Ad12-E1A_{10S}-cDNA ein Fragment mit einer Größe von 245 bp zu erwarten wäre, wurde das 332 bp große Fragment kloniert und durch DNA-Sequenzierung untersucht. Die Sequenzanalysen ergaben, dass das 332 bp-Fragment durch eine Fehlhybridisierung des 5'-E1A_{10S}-Primers an die genomische Ad12-E1A-cDNA, die Ad12-E1A_{13S}-cDNA oder die Ad12-E1A_{12S}-cDNA entstanden ist (Daten nicht gezeigt). Aus den RT-PCR-Untersuchungen geht demnach hervor, dass die Punktmutation im ersten Spleißdonor die Prozessierung der mRNAs für das Ad12-E1A_{10S/11S}- und das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein in den Ad12-E1Am-Zelllinien verhindert, die Ad12-E1Awt-Zelllinien hingegen alle erwarteten mRNAs synthetisieren können. RT-PCR-Analysen mit Gesamt-RNA aus den Ad12-13S-Zelllinien ergaben, dass die Ad12-13S-Zelllinie Ad12-13Swt3 die Ad12-E1A_{10S}-cDNA prozessieren kann. In revers transkribierter RNA der Ad12-13Sm-Zelllinien konnte hingegen nur die Ad12-E1A_{13S}-cDNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

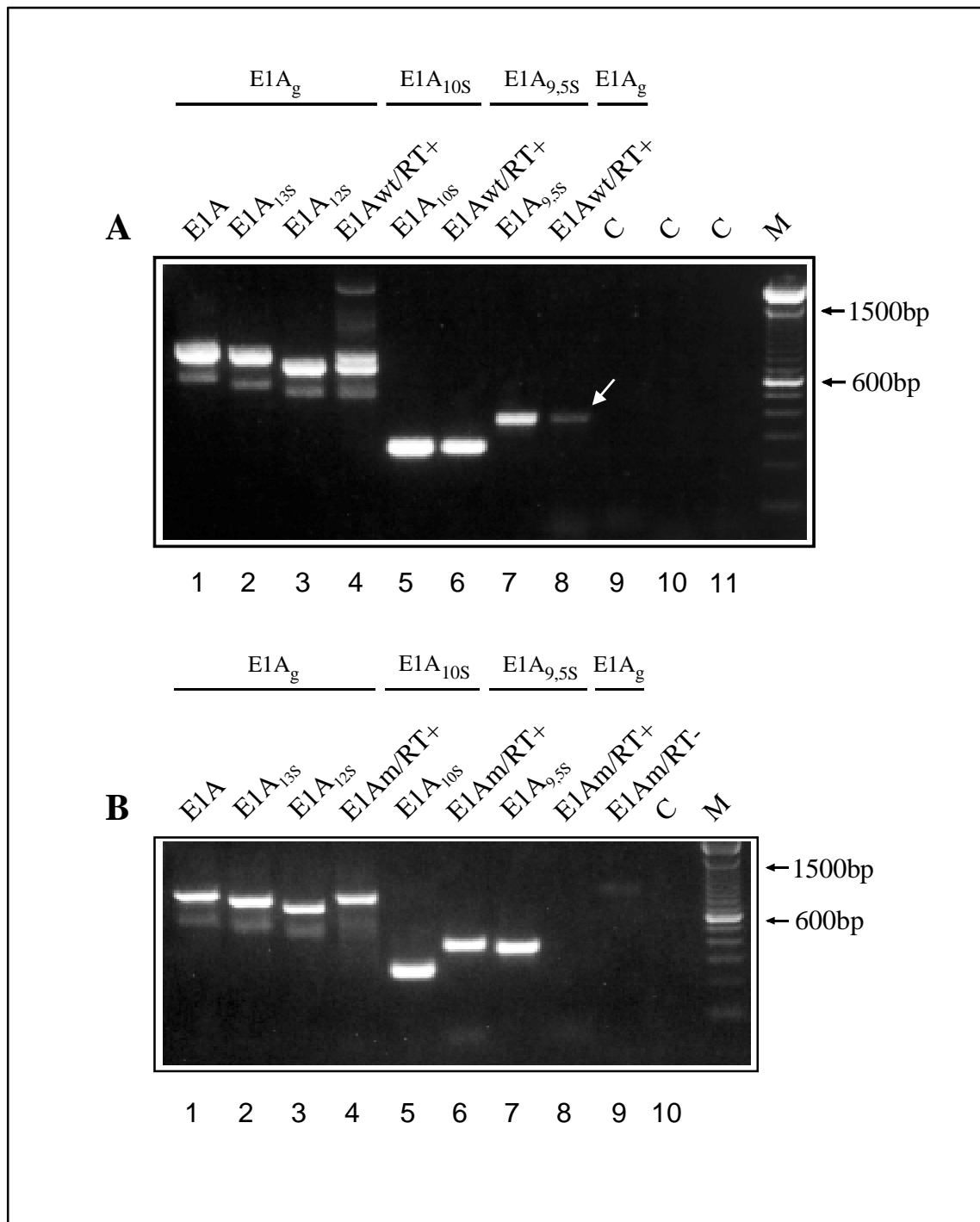


Abb. 7 Identifizierung der Ad12-E1A-Spleißprodukte in Ad12-E1Awt- und Ad12-E1Am-Zelllinien. RT-PCR-Analysen von Gesamt-RNA einer repräsentativen Ad12-E1Awt- (**A**) und einer Ad12-E1Am- (**B**) transformierten BMK-Zelllinie. Die Ad12-E1A-Genprodukte wurden mit spezifischen Primern für d12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} ($E1A_g$, Spuren 4), für Ad12-E1A_{10S} ($E1A_{10S}$, Spuren 6) oder Ad12-E1A_{9,5S} ($E1A_{9,5S}$, Spuren 8) detektiert. Als Kontrollen diente Plasmid-DNA des Ad12-E1A-Gens (Spuren 1), sowie der cDNAs von Ad12-E1A_{13S} (Spuren 2), Ad12-E1A_{12S} (Spuren 3), Ad12-E1A_{10S} (Spuren 5) und Ad12-E1A_{9,5S} (Spuren 7). RT+: Spuren mit cDNA nach reverse Transkription. (**A**) Die Spuren 9-11 zeigen Kontrollreaktionen ohne DNA-Matrize. (**B**) Spur 9: RT-PCR-Reaktion ohne Reverse-Transkriptase (RT-); Spur 10: Kontrollreaktion ohne DNA-Matrize.

4.1.3 Untersuchung des Integrationsmusters der Ad12-E1A-, Ad12-13S- und Ad12-E1B-Konstrukte im Genom der transformierten BMK-Zelllinien

Um die Unabhängigkeit der transformierten Zelllinien bezüglich der Integrationsstelle der Ad12-E1A-, der Ad12-13S- und der Ad12-E1B-Konstrukte sicherzustellen, wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Die genomische DNA wurde vor der Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese mit der Restriktionsendonuklease *Bgl* II vollständig verdaut. Da dieses Enzym die pBabe-Vektoren pBabe-Neo und pBabe-Hygro je einmal (siehe **Abb. 5**), die viralen Konstrukte jedoch gar nicht schneidet, repräsentiert eine Bande im Southern-Blot je eine Integration eines Provirus. In **Abb. 8 A** ist das Fluorogramm eines Southern Blots mit DNA dreier Ad12-E1Awt-Zelllinien nach Hybridisierung mit einer Ad12-E1A-spezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonde dargestellt. Die Zelllinie Ad12-E1Awt3 (Spur 4) trägt demnach eine, Ad12-E1Awt1 (Spur 6) drei und die Zelllinie Ad12-E1Awt2 (Spur 5) vier Kopien des Ad12-E1Awt-Provirus. Hybridisierung desselben Blots mit einer Ad12-E1B-spezifischen DNA-Sonde (**Abb. 8 B**) zeigte die Integration einer Kopie der Ad12-E1B-Region in der Zelllinie Ad12-E1Awt1 (Spur 6). Zwei Kopien von Ad12-E1B wurden in der Zelllinie Ad12-E1Awt2 (Spur 5) und mindestens drei Kopien in der Zelllinie Ad12-E1Awt3 (Spur 4) detektiert. Das unterschiedliche Laufverhalten der DNA-Fragmente mit den integrierten Proviren beweist, dass die untersuchten Zelllinien von unabhängigen Transformationsprozessen stammen.

Die Resultate der Untersuchung der Ad12-E1Am-Zelllinien sind in **Abb. 8 C** und **8 D** dargestellt. Die Zelllinien Ad12-E1Am1 (Spuren 5) und Ad12-E1Am2 (Spuren 6) tragen jeweils eine Integration des Ad12-E1Am- und des Ad12-E1B-Provirus. Ad12-E1Am3 (Spuren 4) trägt jeweils zwei Integrationen beider Konstrukte. Das Hybridisierungsmuster zeigt auch im Fall der hier analysierten Ad12-E1Am-Zelllinien, dass es sich um voneinander unabhängige Zelllinien handelt. Auch die durch PCR-Analysen identifizierten Ad12-13Swt- und Ad12-E1A-13Sm-Zelllinien wurden durch Southern-Blotting auf deren Unabhängigkeit hin untersucht. Dabei wurden zwei voneinander unabhängige Ad12-13Swt-Zelllinien (Ad12-13Swt2 und Ad12-13Swt3) und drei voneinander unabhängige Ad12-13Sm-Zelllinien (Ad12-13Sm1, Ad12-13Sm2 und Ad12-13Sm3) identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt wurden 15 Ad12-E1Awt-Zelllinien mit einer genomischen E1A-Integration identifiziert. Vier Zelllinien trugen eine Ad12-E1A_{13S}-cDNA. Bei zwei Zelllinien war keine Integration eines Ad12-E1A-Konstrukts mit intakten 5'- und 3'-Enden nachweisbar. Von den

Zelllinien mit einer genomischen Integration wurden drei durch Southern-Blotting eindeutig als voneinander unabhängige Klone identifiziert (siehe **Abb. 8**).

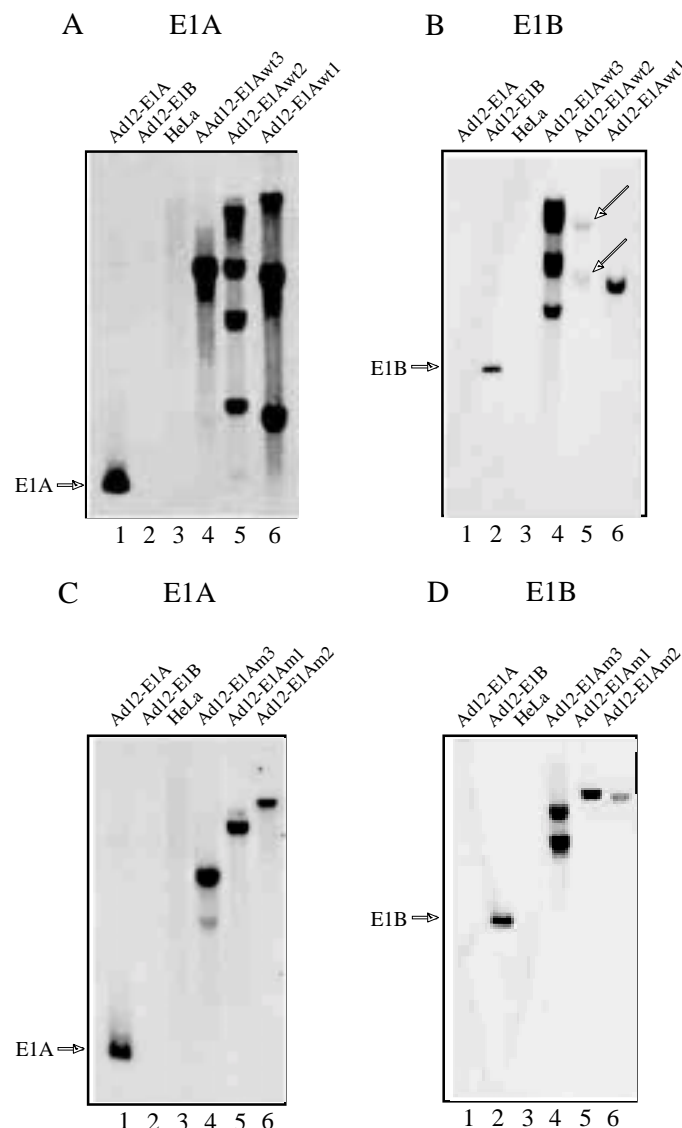


Abb. 8 Untersuchung des Integrationsmusters der Regionen Ad12-E1Awt, Ad12-E1Am und Ad12-E1B im Genom der transformierten BMK-Zelllinien. Southern-Blot-Analysen von DNA der angegebenen Zelllinien. 40 µg *Bgl* II-restringierte genomische DNA jeder Zelllinie wurden auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Membranen wurden mit einer ³²P-markierten Ad12-E1A-Sonde (A, C) und nach deren Entfernung mit einer ³²P-markierten Ad12-E1B-Sonde (B, D) hybridisiert. Da *Bgl* II einmal im Vektor, jedoch nicht in einem der Ad12-E1A/E1B-Konstrukte schneidet, repräsentiert eine Bande eine Integration des entsprechenden Provirus. Als Positivkontrolle diente *Bam* H I-restringierte Plasmid-DNA der Konstrukte pBabe-Neo-Ad12-E1A (Spuren 1) bzw. pBabe-Hygro-Ad12-E1B (Spuren 2). Als Negativkontrolle diente *Bgl* II-restringierte DNA von HeLa-Zellen (Spuren 3).

Von zehn untersuchten Ad12-E1Am-Zelllinien trugen sieben eine genomische Integration des Ad12-E1Am-Konstrukts und drei eine Ad12-E1Am_{13S}-cDNA. Zelllinien ohne eine Ad12-E1Am- oder Ad12-E1Am_{13S}-Integration traten nicht auf. Durch Southern-Blotting

wurden fünf voneinander unabhängige Ad12-E1Am-Zelllinien identifiziert (Daten nicht gezeigt), von denen drei zufällig für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurden (siehe **Abb 8**). Interessanterweise wurde keine Zelllinie identifiziert, die allein durch eine Ad12-E1A_{12S}-cDNA in Kombination mit Ad12-E1B transformiert wurde, obwohl angenommen werden muss, dass auch Ad12-E1A_{12S}-cDNAs in rekombinante Retroviren verpackt werden und primäre BMK-Zellen infizieren können. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in diesem Zellsystem die Ad12-E1A_{12S}-cDNA für die Transformation primärer Zellen nicht ausreicht. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Untersuchungen von Lamberti und Williams (1990) erzielt, die durch Infektion primärer Nagerzellen mit Ad12-Viren, die das Ad12-E1A_{12S}- nicht aber das Ad12-E1A_{13S}-Protein exprimieren, ebenfalls keine transformierten Zelllinien etablieren konnten. Eine Erklärungsmöglichkeit für das Fehlen Ad12-12S/E1B-transformierter Zelllinien ist, dass die Transformation durch Ad12-E1A_{12S}-Protein in Kombination mit Ad12-E1B ein sehr seltenes Ereignis ist und daher bei der Anzahl der untersuchten Klone keine derartige Zelllinie isoliert wurde (siehe auch Diskussion).

4.1.4 Untersuchung der Expression der adenoviralen Proteine Ad12-E1A und Ad12-E1B in den transformierten Zelllinien

Der transformierte Phänotyp sowie die onkogenen Eigenschaften Ad12-E1A/E1B-transformierter Zellen resultieren aus den transregulierenden Funktionen der viralen Proteine. Um die Expression der Ad12-E1A/E1B-Konstrukte in den transformierten BMK-Zelllinien zu verifizieren, wurden Western-Blots durchgeführt.

Gesamtzell-Proteinextrakt der in **Abb. 9** dargestellten Zelllinien wurde auf 12%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und nach dem Blotten mit spezifischen Antikörpern auf die Expression von Ad12-E1A und Ad12-E1B-55 kDa hin analysiert. **Abb. 9 A** zeigt die Ad12-E1A-Expression der Ad12-E1Awt-Zelllinien Ad12-E1Awt1 (Spur 3), Ad12-E1Awt2 (Spur 2) und Ad12-E1Awt3 (Spur 1) sowie der Ad12-E1Am-Zelllinien Ad12-E1Am1 (Spur 4), Ad12-E1Am2 (Spur 5) und Ad12-E1Am3 (Spur 6). Ein Western Blot zum Nachweis der Expression des Ad12-E1B-55 kDa-Proteins ist in **Abb. 9 B** dargestellt. Die Abbildungen **9 C** und **9 D** zeigen die Ergebnisse gleicher Untersuchungen mit den Ad12-13S-transformierten Zelllinien. Die Ad12-13Swt-Zelllinie Ad12-13Swt3 (Spur 4), sowie die Ad12-13Sm-Zelllinien Ad12-13Sm1 (Spur 5), Ad12-13Sm2 (Spur 6) und Ad12-13Sm3 (Spur 7) exprimieren sowohl Ad12-E1A als auch Ad12-E1B-55 kDa. Im Fall der Zelllinie Ad12-13Swt2 (Spur 3) war unter

den gegebenen Bedingungen keine Expression der Virusproteine nachweisbar. Als Ad12-E1A/E1B-55 kDa-Positivkontrolle diente in allen Fällen Extrakt von HEK-12-Zellen (**Abb. 9 A, B**, Spur 7; **Abb. 9 C, D**, Spur 1). Als Negativkontrolle wurde Proteinextrakt primärer BMK-Zellen (**Abb. 9 A, B**, Spur 8) oder Extrakt von NIH3T3-Zellen (**Abb. 9 C, D**, Spur 2) verwendet.

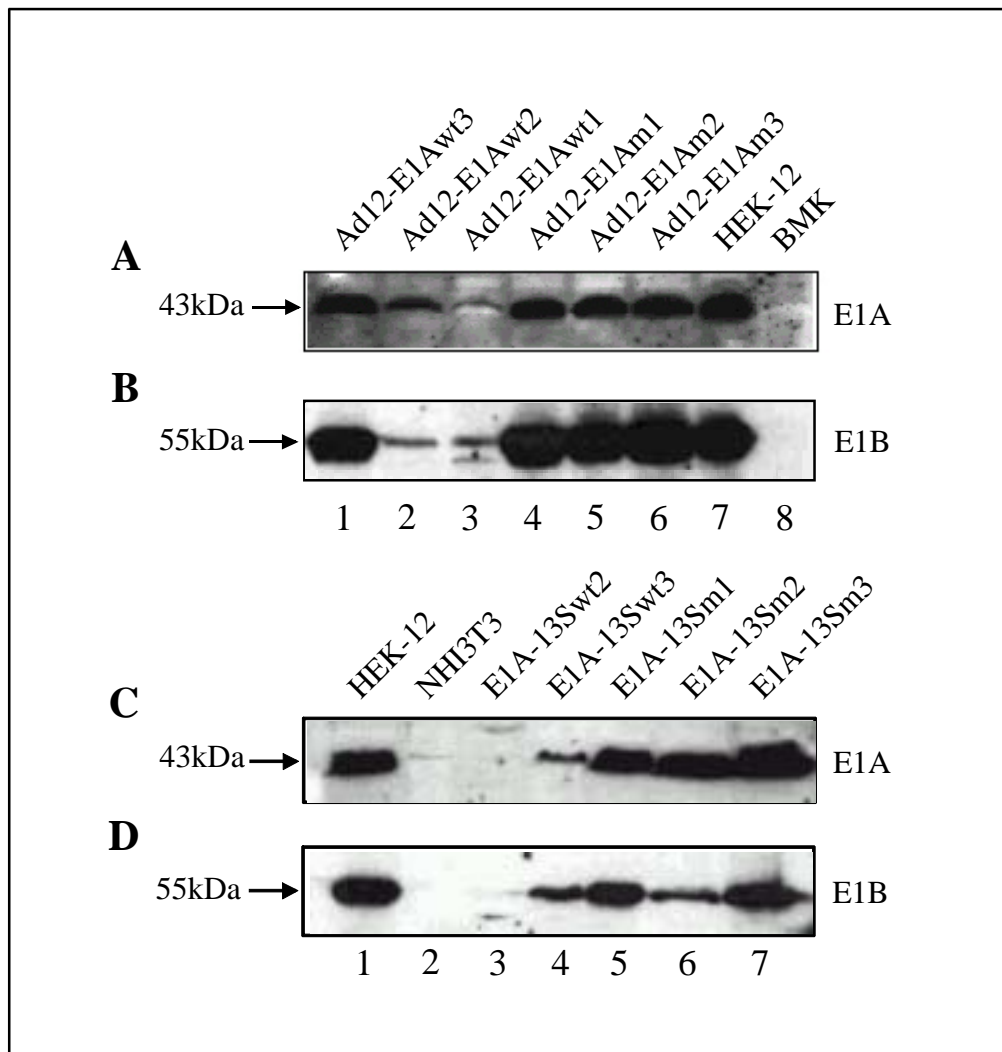


Abb. 9 Expression der adenoviralen Konstrukte Ad12-E1Awt/m, Ad12-13Swt/m und Ad12-E1B in den transformierten BMK-Zelllinien. 50 µg Gesamtzellextrakt der Ad12-E1Awt-Zelllinien (**A, B**) Ad12-E1Awt3 (Spur 1), Ad12-E1Awt2 (Spur 2) und Ad12-E1Awt1 (Spur 3), der Ad12-E1Am-Zelllinien Ad12-E1Am1 (Spur 4), Ad12-E1Am2 (Spur 5) und Ad12-E1Am3 (Spur 6) sowie 70 µg Gesamtzellextrakt der Ad12-13S-Zelllinien (**C, D**) Ad12-13Swt2 (Spur 3), Ad12-13Swt3 (Spur 4), Ad12-13Sm1 (Spur 5), Ad12-13Sm2 (Spur 6) und Ad12-13Sm3 (Spur 7) wurden auf 12%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und durch ElektrobloTTing auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Zur spezifischen Detektion der Ad12-E1A-Proteine wurde ein polyklonales Schaf-Ad12-E1A-Antiserum (**A, C**) und zur Detektion des Ad12-E1B-55 kDa-Proteins ein polyklonales Kaninchen-Ad12-E1B-55 kDa-Antiserum (**B, D**) verwendet. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mit entsprechenden HPO-konjugierten sekundären Antikörpern und einem Chemolumineszenz-Substrat. Als Positivkontrolle diente Extrakt aus Ad12-E1-transformierten HEK-Zellen (Spuren 7 **A, B**, Spuren 1 **C, D**) und als Negativkontrolle wurde Gesamtzellextrakt primärer BMK-Zellen (Spuren 8, **A, B**) bzw. Extrakt von NIH3T3-Zellen (Spuren 2, **C, D**) verwendet.

Zusammenfassend zeigen die Western-Blot-Untersuchungen, dass, mit Ausnahme der Ad12-13Swt-Zelllinie Ad12-13Swt2, alle analysierten Zelllinien die Ad12-spezifischen Regionen Ad12-E1A oder Ad12-13S und Ad12-E1B, wenn auch unterschiedlich stark, exprimieren. Die Zelllinie Ad12-13Swt2 wurde von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da sie entweder spontan transformiert wurde oder die Expression der Virusproteine nachträglich verloren gegangen ist.

4.1.5 Die Fähigkeit der transformierten BMK-Zelllinien in Weichagar zu wachsen ist unabhängig von der Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S}

Die Fähigkeit von Zellen, in Weichagar und damit unabhängig von Anheftungsflächen zu wachsen, ist eine Grundeigenschaft transformierter Zellen (Macpherson und Montagnier, 1964) und korreliert häufig mit der Tumorigenität *in vivo* im Nacktmausmodell (Freedman und Shin, 1974). Da nur vollständig transformierte Zelllinien in die Tumorigenitätsstudien eingesetzt werden sollten, wurden die bis zu diesem Stadium charakterisierten Zelllinien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Klone in Weichagar zu bilden, untersucht. Zelllinien, die unter diesen Bedingungen keine Klone bilden konnten, wurden von den Tumorigenitätsstudien ausgeschlossen.

Untersuchungen von Lamberti und Williams (1990) ergaben, dass Ad12-Viren, die als Folge einer Punktmutation das Ad12-E1A_{12S}-Protein nicht generieren, sowohl in der Lage sind, primäre Nagerzellen zu transformieren als auch ein Tumorwachstum in immunkompetenten Tieren zu induzieren. Dabei bleibt jedoch offen, inwieweit andere virale Proteine, wie z. B. das E4orf4-Protein, fehlende Ad12-E1A-Funktionen (z. B. durch den Verlust des Ad12-E1A_{12S}-Proteins) komplementieren. Daher wurden durch die PCR-Analysen identifizierte Ad12-E1A_{13S}-transformierte Zelllinien ebenfalls in die Transformations- und Onkogenitätsstudien einbezogen. Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob Zellen, die als einzige virale Sequenzen die Ad12-E1A_{13S}-cDNA und die Ad12-E1B-Proteine exprimieren, vollständig transformiert sind und ob sie in immunkompetenten syngen Tieren ein Tumorwachstum induzieren können. Für diese Untersuchungen wurden die Ad12-13S-Wildtyp-Zelllinie Ad12-13Swt3 sowie die Ad12-13S-Mutanten-Zelllinien Ad12-13Sm1, Ad12-13Sm2 und Ad12-13Sm3 ausgewählt.

Wie aus **Tab. 1** ersichtlich erreichen die untersuchten Ad12-E1Awt-Zelllinien unter diesen Bedingungen Wachstumsraten von 5,8% und 16,8%. Die Zelllinie Ad12-E1Awt2

wurde im Rahmen dieser Versuchsreihe nicht untersucht. Die Ad12-E1Am-Zelllinien Ad12-E1Am1, Ad12-E1Am2 und Ad12-E1Am3 zeigten zu den Wildtypzelllinien vergleichbare Wachstumsraten in einem Bereich von ca. 8-16% (**Tab. 1**). Es konnte keine Korrelation zwischen dem exprimierten E1A-Konstrukt und der Wachstumsrate in Weichagar festgestellt werden. Ebenso ist die prozentuale Wachstumsrate unabhängig von der Höhe der Expression der Ad12-E1A- oder der Ad12-E1B-Proteine (vergleiche **Tab. 1** mit **Abb. 9**). Die Zellen der Ad12-13Swt-Zelllinie Ad12-13Swt3 bildeten zu 56% Klone in Weichagar, dagegen zeigten die Ad12-13Sm-Zelllinien teilweise sehr niedrige Wachstumsraten von 1% und 1,8%. Lediglich Ad12-13Sm2 bildete mit durchschnittlich 14,2% Weichagarwachstum in vergleichbarem Umfang Klone wie die Ad12-E1Awt/m-transformierten Zelllinien. Primäre BMK-Zellen wuchsen erwartungsgemäß nicht zu Weichagarklonen aus.

Tab.1: Wachstumsrate der Ad12-E1Awt- und der Ad12-E1Am-Zelllinien in Weichagar

Zelllinie	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Ø aus allen Experimenten	Wachstum nach 2 Wochen (%) ⁺
Ad12-E1Awt3	1140	1633	1979	1965	1679	16,8
Ad12-E1Awt1	217	511	n. u.	1024	584	5,8
Ad12-E1Awt2	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.
Ad12-E1Am1	845	817	n. u.	742	801	8,0
Ad12-E1Am2	1377	1612	1427	2014	1608	16,1
Ad12-E1Am3	969	1874	n. u.	1088	1310	13,1
Ad12-13Swt3	4857	6714	5238	n. u.	5603	56,0
Ad12-13Sm1*	100	228	3071	n. u.	1133	1,1
Ad12-13Sm2*	9428	14357	18750	n. u.	14178	14,2
Ad12-13Sm3*	1571	2261	1696	n. u.	1843	1,8
BMK	0	0	0	n. u.	0	0

n. u. : nicht untersucht

* : 1 x 10⁵ Zellen ausgesät

+ : Anzahl der Zellen, die von 100 ausgesäten Zellen Klone gebildet haben

Da die Ad12-E1Awt- und die Ad12-E1Am-Zelllinien vergleichbare Wachstumsraten in Weichagar aufweisen, zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die Fähigkeit Ad12-E1A/E1B-transformierter BMK-Zellen, in Weichagar Klone zu bilden, unabhängig von der Expression der Proteine Ad12-E1A_{9,5S} und Ad12-E1A_{10S/11S} ist. Im Fall der Ad12-13S-Zelllinien besteht hingegen eine deutliche Korrelation zwischen dem exprimierten Ad12-13S-Konstrukt und der prozentualen Weichagarwachstumsrate. Es besteht demnach eine Korrelation zwischen der

Fähigkeit zur Expression des Ad12-E1A_{10S/11S}-Proteins im Fall der Zelllinie Ad12-13Swt1 (Daten nicht gezeigt) und einer gegenüber den Ad12-13Sm-Zelllinien deutlich erhöhten Wachstumsrate in Weichagar.

4.2 Untersuchung der Tumorigenität der transformierten BMK-Zelllinien *in vivo*

Nach Abschluss der molekularen Charakterisierung der transformierten Mauszelllinien wurde deren Tumorigenität in immundefizienten sowie in immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen untersucht. Diese *in vivo* Studien sollten die Fragestellung, inwieweit die Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} für die Ausbildung des onkogenen Phänotyps mitverantwortlich ist, im Tierversuch beantworten. Vorab sollten Tumorinduktionsstudien in Nacktmäusen Auskunft darüber geben, ob die transformierten Zelllinien im Tiermodell zu Tumoren auswachsen können.

Durch Bestimmung der Dichte der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche wurde zudem untersucht, ob die verwendeten Ad12-E1A-Konstrukte die Expression dieser Komponenten des zellulären Immunsystems auf unterschiedliche Weise beeinflussen und ob eine Korrelation zwischen der MHC-Klasse-I-Expression und der Tumorigenität in immunkompetenten syngen Tieren besteht.

4.2.1 Der Verlust der Fähigkeit zur Expression des Ad12-E1A_{9,5S}- und des Ad12-E1A_{10S/11S}-Proteins korreliert mit einer verlängerten Latenzzeit bis zur Bildung von Tumoren in immundefizienten Mäusen

Alle Ad12-E1Awt/m- und Ad12-13Swt/m-Zelllinien, die im Weichagar Klone gebildet hatten, wurden auf ihre Fähigkeit zur Tumorinduktion in immundefizienten Mäusen hin untersucht. Dazu wurden in Versuchsreihen mit jeweils zwei bis drei Tieren 1×10^7 Zellen der zu analysierenden Zelllinien subkutan im Bereich der rechten Flanke weiblicher NMRI^{nu/nu}-Mäuse injiziert. Anschließend wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen auf die Bildung von Tumoren hin untersucht. Bei einigen Zelllinien wurde zudem eine Größenverlaufskurve der gewachsenen Tumoren erstellt. Dazu wurden die Tumoren täglich in zwei Ebenen vermessen und das Tumolvolumen nach Sanchez *et al.* (1994) bestimmt (siehe Legende **Abb. 10**).

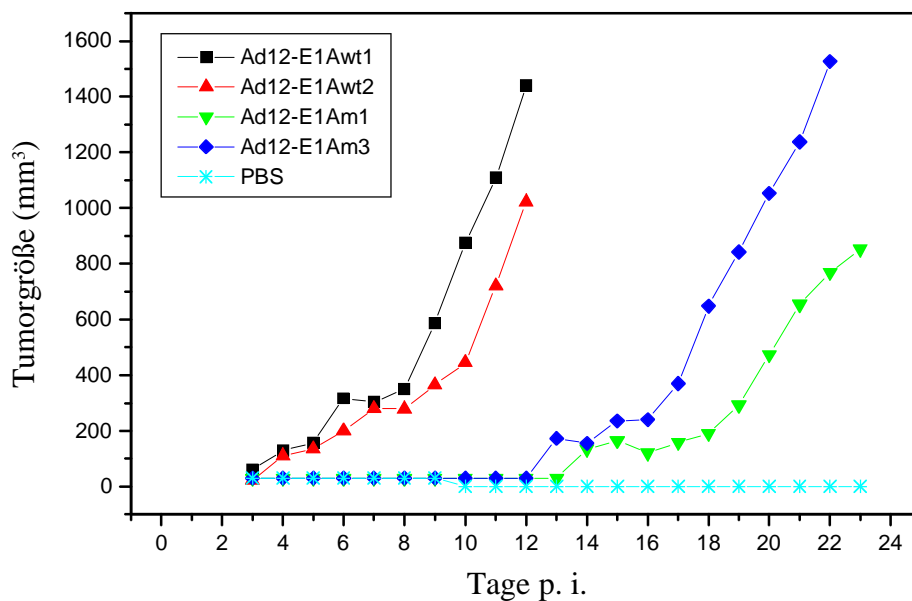


Abb. 10 Tumorverlaufskurve nach Injektion Ad12-E1Awt- und Ad12-E1Am-transformierter BMK-Zelllinien in Nacktmäuse. 1×10^7 in $200 \mu\text{l}$ PBS suspendierte Zellen der Zelllinien Ad12-E1Awt1 (schwarze Linie), Ad12-E1Awt2 (rote Linie), Ad12-E1Am1 (grüne Linie) und Ad12-E1Am3 (dunkelblaue Linie) wurden in die rechte Flanke 4-8 Wochen alter Nacktmäuse injiziert. Die Größe der Tumoren wurde täglich in zwei Ebenen gemessen und das Tumolvolumen nach der folgenden Formel abgeschätzt: $V = (a^2 \times b^2)/2$; $a > b$ (Sanchez *et al.*, 1994). Die angegebenen Tumorgößen sind Durchschnittswerte dreier injizierter Tiere pro Experiment. PBS (hellblaue Linie) diente als Negativkontrolle.

Abb. 10 zeigt, dass die Ad12-E1Awt-Zelllinien Ad12-E1Awt1 und Ad12-E1Awt2 bereits innerhalb von 3-4 Tagen nach Injektion der Zellen Tumoren ausbildeten. Diese Tumoren nahmen sehr schnell an Größe zu und erreichten bereits nach 12 Tagen Größen von 1000 mm^3 (Ad12-E1Awt2) bzw. 1450 mm^3 (Ad12-E1Awt1).

Die Zelllinie Ad12-E1Awt3 bildete in einem vergleichbaren Zeitraum in keinem Fall Tumoren aus. Lediglich in einer von 6 Mäusen bildete sich nach 5 Wochen ein Tumor (siehe **Tab. 2**). In daraus rekultivierten Zellen konnte jedoch keine Ad12-E1A-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Grund für das Ausbleiben der Ad12-E1A-Expression in diesem Tumor ist nicht klar. Da jedoch in diesem Fall das Tumorstadium nicht mit der Expression von Ad12-E1A korreliert, wurde diese Zelllinie von den weiteren Onkogenitätsstudien in immunkompetenten Tieren ausgeschlossen.

Die Ad12-E1Am-Zelllinien Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am3 wuchsen in allen Fällen zu Tumoren aus, zeigten aber verglichen mit den Ad12-E1Awt-Zelllinien eine verlängerte Latenzzeit von 9-10 Tagen bis zur Induktion eines Tumorstadiums (**Abb. 10**). Nach ca.

14 Tagen bildeten auch diese Zelllinien Tumoren, die anschließend wie die Ad12-E1Awt-Zelllinien ein exponentielles Wachstumsverhalten zeigten. 22 bzw. 23 Tage p. i. erreichten die Tumoren der Zelllinien Ad12-E1Am3 und Ad12-E1Am1 Volumina von 1500 mm³ (Ad12-E1Am3) und 850 mm³ (Ad12-E1Am1; siehe **Abb. 10**). Die Zelllinie Ad12-E1Am2 bildete ebenfalls in 3 von 3 Tieren Tumoren (**Tab. 2**). Eine Zeitkinetik wurde für diese Zelllinie nicht erstellt. Als Kontrollzelllinie diente die Ad5-E1-transformierte Zelllinie Ad5Me (Soddu und Lewis, 1992), die erwartungsgemäß in 2 von 2 Tieren ein Tumorstadium induzierte (**Tab. 2**). PBS diente als Negativkontrolle (**Abb. 10**). Von mindestens einem Tier jeder Ad12-E1Awt/m Zelllinie wurde Tumorgewebe zur Proteinextrahtherstellung oder Rekultivierung von Tumorzellen entnommen. Mit Ausnahme des Tumors der Zelllinie Ad12-E1Awt3 konnte in allen Fällen die Ad12-E1A-Expression in Tumorgewebe bzw. in rekultivierten Zellen durch Western-Blotting nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Zelllinie Ad12-E1Am4 bildete in keiner von 4 Mäusen einen Tumor und wurde daher ebenfalls nicht weiter untersucht.

Die Ad12-13S-Zelllinien wurden ebenfalls auf ihre Tumorigenität in Nacktmäusen hin untersucht (**Tab. 2**). Bei Injektion von 1×10^7 Zellen bildete die Zelllinie Ad12-13Swt3 nach 8 bzw. 13 Tagen in 2 von 2 Tieren Tumoren. Die Ad12-13Sm-Zelllinien Ad12-13Sm2 und Ad12-13Sm3 induzierten erst nach zum Teil deutlich verlängerten Latenzzeiten zwischen 15 und 70 Tagen p. i. (siehe **Tab. 2**, eckige Klammern) ein Tumorstadium in jeweils 1 (Ad12-13Sm2) bzw. 2 von 2 Tieren (Ad12-13Sm3). Bei Injektion von $2,5 \times 10^7$ Zellen pro Tier wuchsen beide Zelllinien in je einem Tier zu einem Tumor aus. Interessanterweise konnte in 3 der Tumoren unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Ad12-E1A-Expression nachgewiesen werden. Die Ursache für den Verlust der Ad12-E1A-Expression ist nicht geklärt. Diese Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Tumorbildung durch die Ad12-13Sm-Zelllinien unabhängig von einer Ad12-E1Am_{13S}-Expression ist.

Tab. 2 Tumorwachstum Ad12-E1Awt- Ad12 E1Am-und Ad12-13S-transformierter Zelllinien in immundefizienten NMRI^{nu/nu}-Mäusen

Zelllinie	Anzahl Tumoren/Gesamtanzahl Mäuse	
	1 x 10 ⁷ Zellen	2,5 x 10 ⁷ Zellen
Ad12-E1Awt1	5 / 5	n. u.
Ad12-E1Awt2	5 / 5	n. u.
Ad12-E1Awt3	1* / 6	n. u.
Ad12-E1Am1	5 / 5	n. u.
Ad12-E1Am2	3 / 3	n. u.
Ad12-E1Am3	5 / 5	n. u.
Ad12-E1Am4	0 / 4	n. u.
Ad5Me	2 / 2	n. u.
Ad12-13Swt3	2 / 2	n. u.
Ad12-13Sm2	1* / 2 [42 d]	1 / 2 [70 d]
Ad12-13Sm3	1, 1* / 2 [32 d, 47 d]	1* / 1 [15 d]

* : keine Ad12-E1A-Expression in Tumorgewebe/rekultivierten Zellen nachweisbar

[] : Latenzzeit in Tagen

n. u. : nicht untersucht

4.2.2 Die verlängerte Latenzzeit bei der Tumorinduktion durch die Ad12-E1Am-Zelllinien ist nicht die Folge einer verlangsamten Proliferation

Die Tumorigenitätsstudien in immundefizienten Nagern zeigen, dass mit Ausnahme der Zelllinien Ad12-E1Awt3 und Ad12-E1Am4 alle untersuchten Zelllinien in Nacktmäusen ein Tumorwachstum induzierten. Die Ad12-E1Am-Zelllinien bildeten jedoch erst nach einer verlängerten Latenzzeit Tumoren. Um ausschließen zu können, dass die verlängerte Latenzzeit die Folge einer verlangsamten Proliferationsrate der untersuchten Ad12-E1A-Mutantenzelllinien ist, wurden die Wachstumsgeschwindigkeiten der Ad12-E1Awt-Zelllinien und der Ad12-E1Am-Zelllinien ermittelt. Die Ergebnisse dieser Studien sind in **Abb. 11** dargestellt.

Bei diesen Untersuchungen wurde für die Ad12-E1Awt-Zelllinie Ad12-E1Awt1 (schwarze Linie) die höchste und für Ad12-E1Awt2 (rote Linie) die geringste Proliferationsrate ermittelt. Die Wachstumsgeschwindigkeiten der Ad12-E1Am-Zelllinien lagen zwischen denen der Ad12-E1A-Wildtypzelllinien.

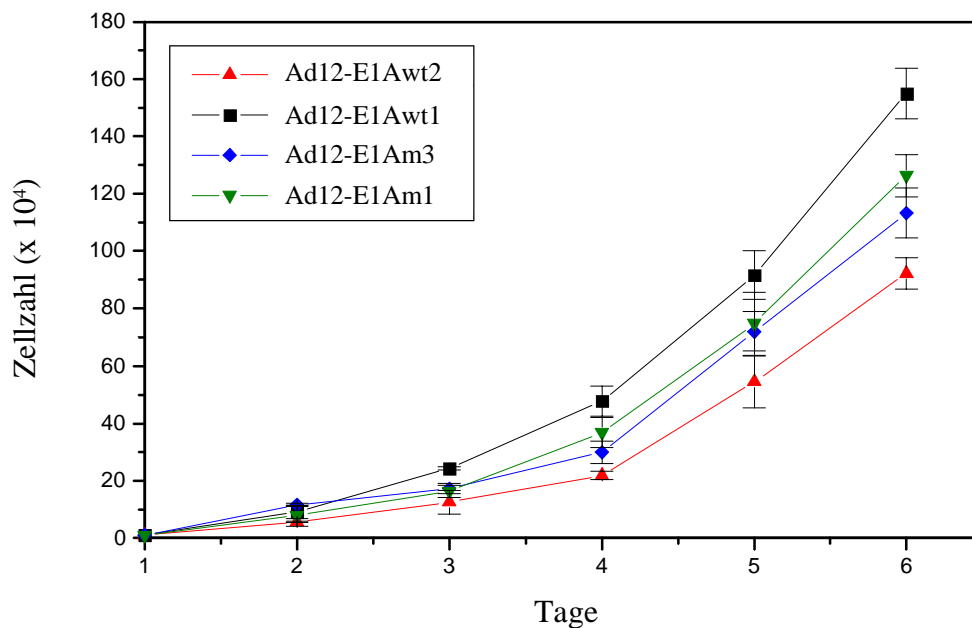


Abb. 11 Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Ad12-E1Awt- und Ad12-E1Am-transformierten BMK-Zelllinien. Zur Bestimmung der Teilungsrate wurden 1×10^4 Zellen jeder Zelllinie in der Vertiefung einer 6-well-Platte ausgesät. Die Zellen je einer Vertiefung wurden anschließend über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich durch Trypsinieren geerntet und die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt.

Die Daten aus den Proliferationsstudien verdeutlichen, dass die verlängerte Latenzzeit bei der Tumorbildung durch die Ad12-E1Am-Zelllinien nicht die Folge einer verringerten Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen ist. Dagegen korreliert der Verlust der Fähigkeit zur Expression der Ad12-E1A-Proteine Ad12-E1A_{9,5S} und Ad12-E1A_{10S/11S} mit einer verlängerten Latenzzeit bis zur Bildung von Tumoren in Nacktmäusen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nicht der Verlust der Ad12-E1A_{9,5S}- und/oder der Ad12-E1A_{10S}-Expression, sondern die Punktmutation in den Proteinen Ad12-E1Am_{13S} oder Ad12-E1Am_{12S} für die verlängerte Latenzzeit verantwortlich ist (siehe auch Abschnitt 5.2).

4.2.3 Ad12-E1Am-transformierte Zelllinien, die das Ad12-E1A_{9,5S}- und das Ad12-E1A_{10S}-Protein nicht exprimieren, zeigen eine verringerte Fähigkeit zur Tumorinduktion in immunkompetenten syngenesischen Mäusen

Tumorinduktionsversuche in immunkompetenten syngenesischen BALB/c-Mäusen sollten klären, ob das Fehlen der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} die Tumorigenität Ad12-E1A-

transformierter Zellen beeinflusst. Dazu wurden 4-8 Wochen alten BALB/c-Mäusen jeweils 1×10^7 oder 5×10^7 Zellen der Zelllinien Ad12-E1Awt1, Ad12-E1Awt2, Ad12-E1Am1, Ad12-E1Am2 und Ad12-E1Am3 injiziert, die im Nacktmausmodell Tumoren gebildet hatten. In jeder Versuchsreihe wurden jeweils 3 Tiere pro Zelllinie eingesetzt. Die Ergebnisse von insgesamt drei Versuchsreihen sind in **Tab. 3** zusammengefasst.

Tab. 3 Tumorwachstum Ad12-E1Awt- und Ad12 E1Am-transformierter Zelllinien in immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen

Zelllinie	Anzahl Tumoren/Gesamtanzahl Mäuse	
	1×10^7 Zellen	5×10^7 Zellen
Ad12-E1Awt1	6*/6	3*/3
Ad12-E1Awt2	6*/6	3*/3
Ad12-E1Am1	0/6	0/3
Ad12-E1Am2	2/6	2*/3
Ad12-E1Am3	0/6	0/3
BMK	0/3	n. u.
Ad5Me	0/3	n. u.
Ad12-E1Am1/Re	0/3	n. u.
Ad12-E1Am3/Re	0/3	n. u.
Ad12-13Swt3	n. u.	0/3

* : Tumoren bildeten sich 16-17 Tage p. i. vollständig zurück

n. u. : nicht untersucht

Die Ad12-E1Awt-Zelllinien Ad12-E1Awt1 und Ad12-E1Awt2 wuchsen bereits kurze Zeit nach der Injektion zu Tumoren mit einer Größe von bis zu 660 mm^3 aus, wie u. a. *in vivo* durch Magnetresonanztomografien bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu induzierten die Zelllinien Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am3 auch nach einer verlängerten Latenzzeit kein Tumorwachstum in insgesamt 9, mit zwei unterschiedlichen Zellzahlen injizierten Tieren (**Tab. 3**). Die Zelllinie Ad12-E1Am2 induzierte ein Tumorwachstum in 2 von 6 (bei Injektion von 1×10^7 Zellen) bzw. in 2 von 3 (bei Injektion von 5×10^7 Zellen) Tieren 16-17 Tage nach Injektion der Zellen. Diese Tumoren erreichten Größen zwischen 1700 mm^3 und 2200 mm^3 . Zwei Tumoren der Zelllinie Ad12-E1Am2 bildeten sich nach acht Wochen vollständig zurück. Entgegen unseren Erwartungen begannen sich auch die Ad12-E1Awt-Tumoren zwischen 10 (Ad12-E1Awt2) und 14 (Ad12-E1Awt1) Tagen p. i. zurückzubilden und verschwanden 16-17 Tage p. i. vollständig. Der Grund für die

Tumorregression bei Ad12-E1Awt- und Ad12-E1Am-Tumoren ist nicht klar, war aber Gegenstand der weiteren Untersuchungen (siehe Abschnitt 4.2.4 und 5.5). Die einzige Zelllinie, die durch eine Ad12-E1A_{13S}-cDNA in Kombination mit Ad12-E1B transformiert wurde (Ad12-13Sw3), bildete trotz Injektion von 5×10^7 Zellen auch nach einer verlängerten Latenzzeit keine Tumoren in 3 von 3 Versuchstieren. Erwartungsgemäß bildeten weder die Ad5-E1-transformierte Zelllinie Ad5Me (Soddu und Lewis, 1992) noch primäre BMK-Zellen Tumoren in BALB/c-Mäusen (siehe **Tab. 3**).

Da die Zelllinien Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am3 bereits in Nacktmäusen eine verlängerte Latenzzeit bis zum Auftreten von Tumoren gezeigt hatten, bestand die Möglichkeit, dass diese Zelllinien generell mit geringerer Effizienz in Versuchstieren zu Tumoren auswachsen als die Ad12-E1Awt-Zelllinien. Um ausschließen zu können, dass das Ausbleiben eines Tumorwachstums in BALB/c-Mäusen die Folge einer reduzierten Fähigkeit zur Tumorbildung im Versuchstier ist, wurden BALB/c-Mäusen je 1×10^7 Zellen injiziert, die von rekultivierten Nacktmaustumoren der Zelllinien Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am3 stammten (Ad12-E1Am1/Re, Ad12-E1Am3/Re). Auch nach einmaliger Passage durch die Nacktmaus waren die Ad12-E1Am-Zelllinien Ad12-E1Am1/Re und Ad12-E1Am3/Re nicht in der Lage, in immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen zu Tumoren auszuwachsen (siehe **Tab. 3**). Somit ist wahrscheinlich nicht die generelle Fähigkeit zur Tumorbildung im Versuchstier, sondern sind andere Zell-Eigenschaften, wie z. B. die Interaktion zellulärer Komponenten mit Bestandteilen des Immunsystems des Wirtstiers, für die fehlende Tumorigenität der Ad12-E1Am-Zelllinien in diesem Tiersystem verantwortlich.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Tumorinduktionsstudien, dass die Ad12-E1Awt-Zelllinien verglichen mit den Ad12-E1Am-Zelllinien ein höheres tumorigenes Potential in immunkompetenten syngen Tieren haben. Dies wird dadurch unterstrichen, dass lediglich 1 von 3 Ad12-E1Am-Zelllinien in der Lage war, in 4 von 9 BALB/c-Mäusen Tumoren zu erzeugen, die untersuchten Ad12-E1Awt-Zelllinien hingegen in allen injizierten Tieren Tumoren bilden. Des Weiteren deutet das nicht-onkogene Verhalten der Zelllinie Ad12-13Sw3 darauf hin, dass für eine Tumorbildung im immunkompetenten Tier durch Ad12-Genprodukte neben der Expression der Ad12-E1A_{13S}-cDNA und Ad12-E1B die Expression eines weiteren viralen Onkogens nötig ist. Diese Ergebnisse müssen jedoch in Zukunft durch die Analyse weiterer unabhängiger Ad12-13S-Zelllinien bestätigt werden.

4.2.4 Die regressiven Tumoren zeigen ausgedehnte nekrotische Bereiche und apoptotische Zellen in überwiegend vitalen Tumorregionen

Um mögliche Ursache für die Regression Ad12-E1A-induzierter Tumoren zu finden, wurden Gewebeschnitte von Nacktmaustumoren und regressiven BALB/c-Tumoren angefertigt, die durch die Zelllinien Ad12-E1Awt1, Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am2 hervorgerufen worden waren. Die Schnitte wurden anschließend entweder mit HE gefärbt oder durch TUNEL-Studien auf das Vorhandensein apoptotischer Zellen untersucht. Durch die HE-Färbung werden Zellkerne violett und zytoplasmatische Bereiche sowie Bindegewebe rot dargestellt. Anhand der hohen Mitoserate in diesen Schnitten wird deutlich, dass alle Tumoren hoch maligne sind (pers. Mitteilung Prof. Dr. K. W. Schmid, Inst. f. Pathologie, Universitätsklinikum Essen, Daten nicht gezeigt). **Abb. 12** zeigt HE-gefärbte Tumorschnitte der Zelllinien Ad12-E1Awt1 Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am2. Vitale Bereiche zeichnen sich durch eine hohe Dichte an Zellkernen aus. Die Tumoren sind jedoch durch teilweise ausgedehnte nekrotische Bereiche charakterisiert, die durch die HE-Färbung rot erscheinen und eine geringe Dichte intakter Zellkerne aufweisen (siehe schwarze Pfeile in **Abb. 12 A, C, D**). Die Nekrosebildung ist höchstwahrscheinlich die Folge einer Minderversorgung der entsprechenden Tumorbereiche über das Blutkreislaufsystem des Wirtstiers. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass sich in ansonsten überwiegend nekrotischen Tumorabschnitten in direkter Nähe von Blutgefäßen vitale Zellen befinden (siehe weißen Pfeil in **Abb. 12 B**). Die unzureichende Neovaskularisation des Tumorgewebes ist wahrscheinlich die Folge des schnellen Tumorstwachstums insbesondere im Fall der Ad12-E1Awt-Tumoren. Zusätzlich zu den Befunden aus den Tumorschnitten weisen Einblutungen besonders im Innern der untersuchten Tumoren in BALB/c-Mäusen auf Nekrose hin (Daten nicht gezeigt).

Die Gewebeschnitte zeigen auch, dass die Tumoren in Nacktmäusen und in den immunkompetenten syngenischen BALB/c-Mäusen gleiche Zelltypen enthalten. So sind z. B. die dargestellten Tumoren der Zelllinie Ad12-E1Awt1 (**Abb. 12 A, B**) in beiden Fällen durch spindelförmiges Wachstum der Zellen charakterisiert. Die unterschiedliche Persistenz der Tumoren in Nacktmäusen und BALB/c-Mäusen wird demnach nicht dadurch hervorgerufen, dass in den beiden Mausstämmen verschiedene Zelltypen zu Tumoren ausgewachsen sind.

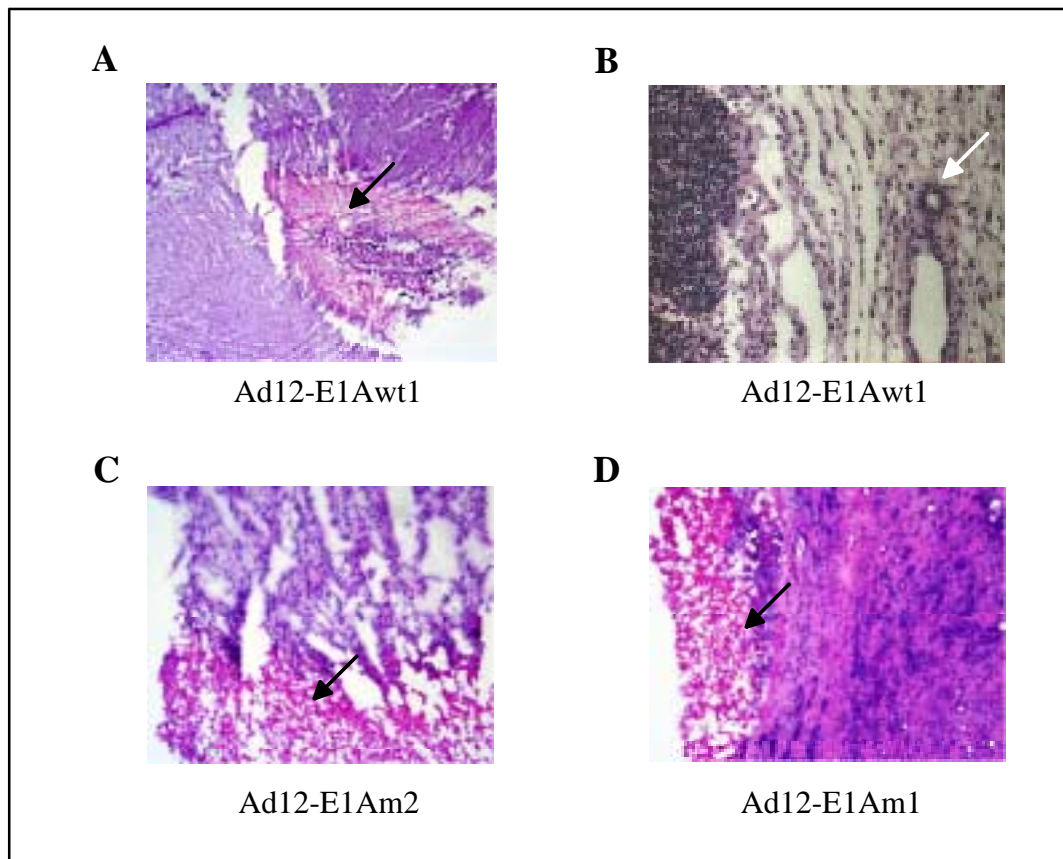


Abb. 12 Darstellung unterschiedlicher Tumorbereiche durch HE-Färbung von Kryoschnitten. Lichtmikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter Schnitte von Tumoren der angegebenen Zelllinien, die durch Injektion von $1-5 \times 10^7$ Zellen in immundefiziente Nacktmäuse (A, C) bzw. in immunkompetente BALB/c-Mäuse (B, D) entstanden sind. Zellkerne sind violett und zytoplasmatische Bereiche sowie Bindegewebe rot gefärbt. Die Schnitte wurden mit 3,5-facher- (A) bzw. 10-facher Vergrößerung (B, C, D) aufgenommen. Die schwarzen Pfeile markieren nekrotische Bereiche, der weiße ein angeschnittenes Blutgefäß.

Durch TUNEL-Studien sollte untersucht werden, ob einer der histologisch unterschiedlichen Tumorbereiche apoptotische Zellen enthält. **Abb. 13** zeigt die Ergebnisse dieser Studien an einem Tumor, hervorgerufen durch Injektion von Zellen der Zelllinie Ad12-E1Awt1 in eine BALB/c-Maus. Ein HE-gefärbter Schnitt verdeutlicht die Zweiteilung des Tumors in einen inneren nekrotischen und einen äußeren Bereich mit überwiegend vitalen Zellen (**Abb. 13 E**). Der innere nekrotische Bereich ist frei von apoptotischen Zellen (**Abb. 13 B, E**), die Außenschicht ist dagegen durch das Auftreten einzelner TUNEL-positiver Zellen charakterisiert (**Abb. 13 A, E**). In **Abb. 13 C** ist als Positivkontrolle ein Schnitt desselben Tumors dargestellt, der vor der TUNEL-Reaktion zusätzlich mit DNase-I behandelt wurde. **Abb. 13 D** zeigt als Negativkontrolle ebenfalls einen Schnitt desselben Tumors, der nur mit TUNEL-Reagenz ohne TdT behandelt wurde.

Die TUNEL-Assay-Daten lassen als weitere Ursache für die Tumorregression die Apoptose von Zellen in den äußeren Tumorbereichen vermuten. Diese könnte z. B. durch eine Immunantwort des Wirtstiers gegen die Tumorzellen hervorgerufen werden (siehe Diskussion).

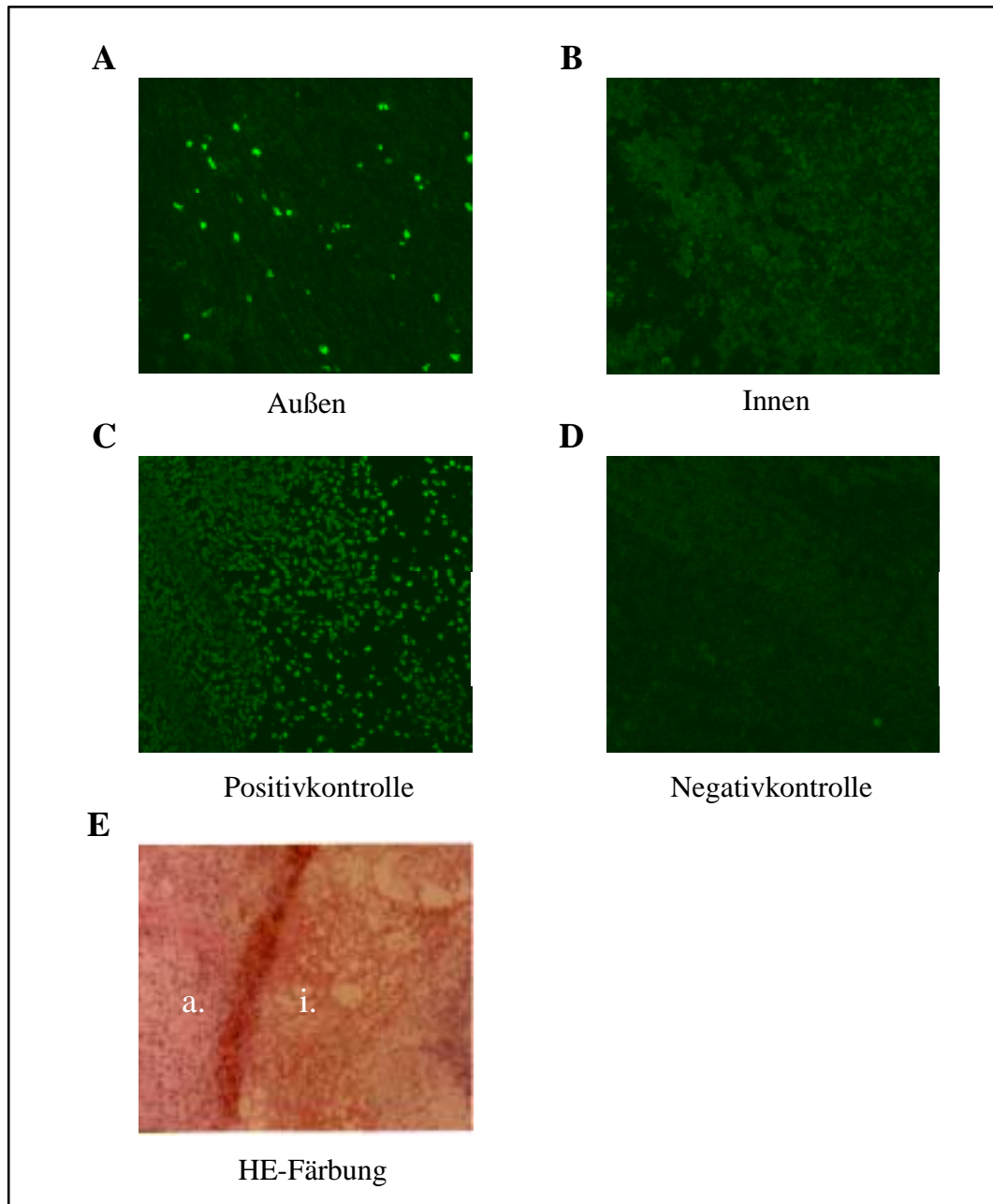


Abb. 13 Nachweis apoptotischer Zellen in Schnitten eines Tumors in BALB/c, hervorgerufen durch die Injektion von Zellen der Zelllinie Ad12-E1Aw1. Dargestellt sind TUNEL-Färbungen der Außenschicht (A) sowie des Innenbereichs (B) von Kryoschnitten eines regressiven Tumors 3 Wochen nach Injektion von 5×10^7 Zellen der Zelllinie Ad12-E1Aw1. (C) TUNEL-Positivkontrolle DNase-I behandelter Schnitte desselben Tumors und (D) Negativkontrolle von Schnitten desselben Tumors nur mit TUNEL-Reagenz ohne TdT. (E) HE-Färbung desselben Tumors. Rote Bereiche repräsentieren zytoplasmatische- und bindegewebige Bereiche. Violett gefärbte Anteile stellen die Kerne vitaler Zellen dar. a.: Außenschicht; i.: Innenbereich

4.2.5 Die Ad12-E1Am-Zelllinien zeigen im Gegensatz zu den Ad12-E1Awt-Zelllinien eine verminderte Repression der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

Als eine entscheidende Ursache für die Tumorigenität Ad12-transformierter Zellen in immunkompetenten syngen Tieren wird die Suppression der zellulären Immunantwort auf der Ebene der MHC-Klasse-I-Expression durch Ad12-E1A-Genprodukte diskutiert (Bernards *et al.*, 1983). Da Ad12-transformierte Zellen demnach keine oder zu geringe Mengen der virusspezifischen Antigene auf der Zelloberfläche präsentieren, werden sie von den zytotoxischen T-Lymphozyten des Wirtsorganismus nicht als infizierte oder transformierte Zellen erkannt und demzufolge nicht eliminiert. Die Suppression der MHC-Klasse-I-Expression verläuft hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene (siehe z. B. Schouten *et al.*, 1995). Untersuchungen unterschiedlicher Autoren haben gezeigt, dass das Ad12-E1A_{13S}-Protein die MHC-Klasse-I-Expression auf transkriptioneller Ebene reprimiert (siehe z. B. Liu *et al.*, 1996; Kushner und Ricciardi, 1999). Bis heute ist jedoch nicht geklärt, ob die Repression der MHC-Klasse-I-Expression durch das Ad12-E1A_{13S}-Protein die Zelle in ausreichendem Maße vor der Immunantwort des Wirtstiers schützen kann oder ob die zusätzliche Expression eines weiteren repressorisch wirkenden Proteins, wie z. B. des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins, nötig ist.

Bereits die Tumorigenitätsstudien in immunkompetenten syngen Tieren haben gezeigt, dass der Verlust der Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und/oder Ad12-E1A_{9,5S} in Ad12-E1-transformierten Zellen eine verringerte Onkogenität zur Folge hat. Untersuchungen der MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche dieser Zellen sollten daher Auskunft darüber geben, ob die verringerte Onkogenität der Ad12-E1Am-Zelllinien mit einer weniger stark reduzierten MHC-Klasse-I-Expression korreliert. Dazu wurde die Dichte der MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche der transformierten Zelllinien mit Hilfe von FACS-Analysen bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte im Durchflusszytometer durch Messung der Fluoreszenz eines Farbstoffs (FITC), der an spezifische Antikörper gegen die H2-k^d-Spezies des MHC-Klasse-I gebunden ist. Dabei musste ausgeschlossen werden, dass allein durch Messung unterschiedlich großer Zellen oder von Zelltrümmern unterschiedlich starke Fluoreszenzen ermittelt wurden. Daher wurden bei den Messungen ausschließlich vitale Zellen und Zellen gleicher Größe berücksichtigt. Die Größe der Zellen wurde durch Untersuchungen im „Forward Scatter“-Kanal bestimmt und abgestorbene Zellen durch Propidium-Jodid-Färbung identifiziert und durch entsprechendes Filtern von der FITC-Messung ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der FACS-Analysen mit den

Ad12-E1A/E1B- bzw. Ad12-13S/E1B-transformierten BMK-Zelllinien sind in **Abb. 14** dargestellt. Die Ad5-E1A/E1B-transformierte BMK-Zelllinie Ad5Me desselben Maus-Stammes (Soddu und Lewis, 1992) diene als Kontrollzelllinie.

Die Ad12-E1Awt-Zelllinien Ad12-E1Awt1 und Ad12-E1Awt2 zeigen keine durch FACS-Analysen nachweisbare MHC-Klasse-I-H2-K^d-Expression auf der Zelloberfläche. Bei den Ad12-E1Am-Zelllinien Ad12-E1Am1, Ad12-E1Am2 und Ad12-E1Am3 wurde gegenüber der Kontrollzelllinie Ad5Me eine stark verringerte Anzahl von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche nachgewiesen, sie exprimieren jedoch eindeutig detektierbare Mengen der untersuchten Oberflächenantigene. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die alleinige Expression der Proteine Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} für eine vollständige Repression der MHC-Klasse-I-Expression nicht ausreicht. Zudem besteht eine direkte Korrelation zwischen der Onkogenität der transformierten Zelllinien in immunkompetenten BALB/c-Mäusen und der vollständigen Repression der MHC-Klasse-I-Expression auf den Ad12-E1Awt-Zelllinien.

Untersuchungen von Lamberti und Williams (1990) ergaben, dass Ad12-Viren, die anstelle der Ad12-E1A-Region die Ad12-E1A_{13S}-cDNA exprimieren, in immunkompetenten syngeneten Tieren tumorigen sind. Daten zur MHC-Klasse-I-Expression der durch entsprechende Viren transformierten Zellen lagen jedoch nicht vor. Es stellt sich demnach die Frage, ob die Ad12-13S-Zelllinien die MHC-Klasse-I-Expression genau so effektiv reprimieren können, wie die Ad12-E1Awt-Zelllinien. Dies wurde anhand der Ad12-13S-Zelllinien Ad12-13Swt3, Ad12-13Sm2 und Ad12-13Sm3 durch FACS-Analysen untersucht. Wie aus **Abb. 14** ersichtlich können weder die Proteinprodukte des Ad12-13Swt- noch das Proteinprodukt des Ad12-13Sm-Konstrukts die MHC-Klasse-I-Expression gleichermaßen effektiv reprimieren wie dies bei den Ad12-E1Awt-Zelllinien der Fall ist. Diese weniger effiziente Repression der MHC-Klasse-I-Expression korreliert zudem mit der Unfähigkeit der Zelllinie Ad12-13Swt3, in immunkompetenten syngeneten Tieren ein Tumorwachstum zu induzieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Transformation primärer BMK-Zellen durch Ad12-Genprodukte die Expression der Ad12-E1A_{13S}-cDNA und Ad12-E1B für die Ausbildung eines onkogenen Phänotyps in immunkompetenten Tieren nicht ausreicht.

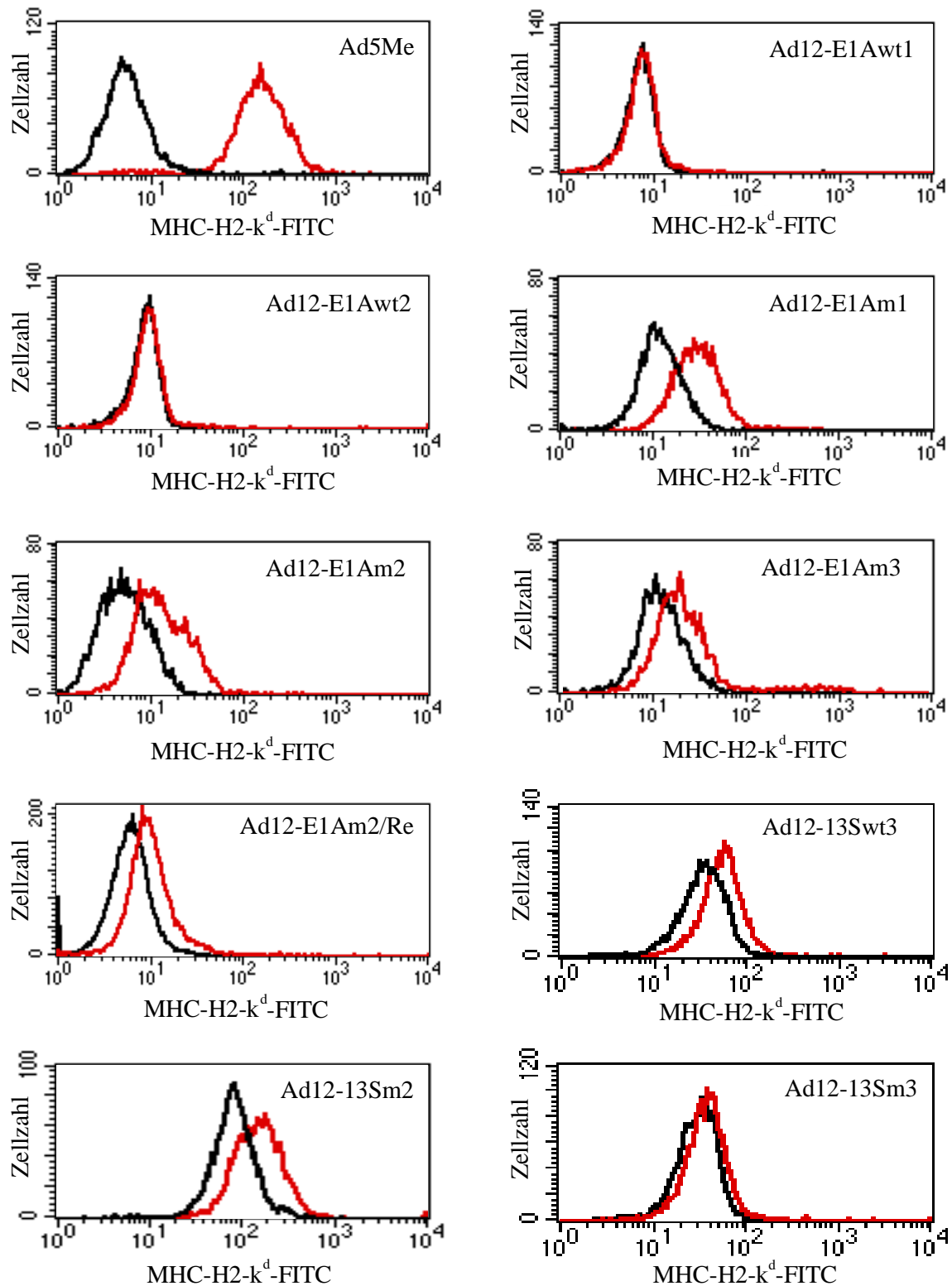


Abb. 14 Bestimmung der Dichte der MHC-Klasse-I-Moleküle auf Ad12-E1Awt/m- und Ad12-13Sw3/m-transformierten Zelllinien. Die Dichte der MHC-Klasse-I-Moleküle wurde bei den Ad12-E1Awt-Zelllinien (Ad12-E1Awt1 und Ad12-E1Awt2), den Ad12-E1Am-Zelllinien (Ad12-E1Am1, Ad12-E1Am2 und Ad12-E1Am3), den Ad12-13S-Zelllinien (Ad12-13Sw3, Ad12-13Sm2 und Ad12-13Sm3) sowie bei den aus einem BALB/c-Tumor reaktivierten Zellen der Zelllinie Ad12-E1Am2 (Ad12-E1Am2/Re) bestimmt. Die Ad5-E1A/E1B-transformierte Zelllinie Ad5Me (Soddu und Lewis, 1992) diente als Kontrolle. Je 1×10^6 oder 2×10^6 Zellen jeder Zelllinie wurden mit einem FITC-markierten monoklonalen Anti-Maus-MHC-Klasse-I-H2-k^d-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenz durch FACS-Analysen bestimmt und mit der Fluoreszenz nicht behandelter Zellen verglichen. Schwarze Linien in den Histogrammen repräsentieren die Fluoreszenzen von Zellen ohne, rote Linien von Zellen mit Antikörperbehandlung.

Neben den Ad12-E1Awt-Zelllinien war auch eine der Ad12-E1Am-Zelllinien (Ad12-E1Am2, siehe **Tab. 3**) bedingt in der Lage, in immunkompetenten Tieren Tumoren zu bilden, obwohl die Zellen dieser Zelllinie eine residuelle MHC-Klasse-I-Expression aufweisen (**Abb. 14**). Eine mögliche Erklärung für die Onkogenität dieser Zelllinie ist, dass eine Subpopulation mit einer ähnlich stark verminderten MHC-Klasse-I-Expression vergleichbar der der Ad12-E1Awt-Zelllinien existiert, die somit vom Immunsystem des Wirtstiers unerkant bleibt und im Tier zu einem Tumor auswachsen kann. Aus diesem Grund wurden Zellen, die aus einem Tumor der Zelllinie Ad12-E1Am2 in BALB/c-Mäusen rekultiviert worden waren, ebenfalls durch FACS-Analysen auf deren MHC-Klasse-I-Expression hin untersucht. Wie aus **Abb. 14** ersichtlich exprimiert die Zelllinie Ad12-E1Am2/Re zu der entsprechenden Ursprungszelllinie vergleichbare Mengen an MHC-Klasse-I-Oberflächenantigenen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die schwache Tumorigenität der Zelllinie Ad12-E1Am2 in immunkompetenten Tieren nicht die Folge des Auswachsens einer Subpopulation mit einer stärker reduzierten MHC-Klasse-I-Expression ist (siehe Diskussion).

Aus den bis zu diesem Zeitpunkt ermittelten Ergebnissen ergibt sich die Fragestellung, welche Faktoren für eine effizientere Repression der MHC-Klasse-I-Expression der Ad12-E1Awt-Zelllinien verantwortlich sind. Da das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein den murinen MHC-Klasse-I-Promotor in transienten Expressionsanalysen reprimiert (Brockmann *et al.* 1996), sollte die Möglichkeit, dass die Proteine Ad12-E1A_{13S}- und Ad12-E1A_{9,5S} eine additive Suppression des MHC-Klasse-I-Promotors bewirken, durch nachträgliche exogene Expression des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins in den nicht-onkogenen Ad12-E1Am-Zelllinien untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein als Fusionsprotein mit einem 6 x Myc-Epitop stabil in den Zelllinien Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am3 exprimiert.

Ausgehend von jeder der beiden Ursprungszelllinien Ad12-E1Am1 (Ad12-E1Am1wt) und Ad12-E1Am3 (Ad12-E1Am3wt) wurden je zwei durch Western-Blotting als Ad12-E1A_{9,5S}-6 x Myc-positiv identifizierte Subzelllinien (Daten nicht gezeigt) durch FACS-Analysen auf deren MHC-Klasse-I-Expressionsstatus hin untersucht. Dabei konnte in keiner der untersuchten Zelllinien eine zusätzliche Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression durch die stabile Überexpression des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins beobachtet werden (**Abb. 15**, siehe Diskussion).

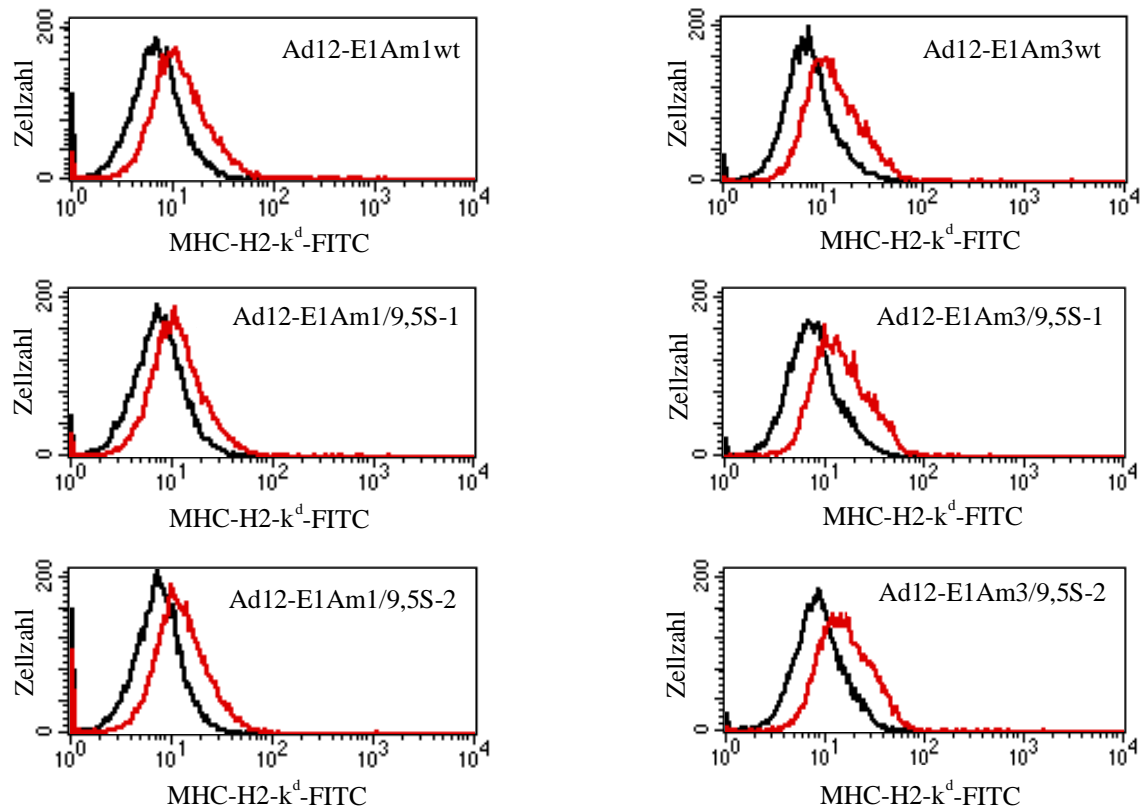


Abb. 15 Bestimmung der Dichte der MHC-Klasse-I-Moleküle auf Ad12-E1Am- und Ad12-E1Am/9,5S-Zelllinien. Je 2×10^6 Zellen jeder Zelllinie wurden mit einem FITC-markierten monoklonalen Anti-Maus-MHC-Klasse-I-H2-k^d-Antikörper inkubiert. Die FITC-Fluoreszenz wurde durch FACS-Analysen bestimmt und mit der Fluoreszenz nicht behandelter Zellen verglichen. Schwarze Linien in den Histogrammen repräsentieren die Fluoreszenzen von Zellen ohne, rote Linien von Zellen mit Antikörperbehandlung.

4.3 Die Rolle des Kofaktors p300 bei der onkogenen Transformation primärer BMK-Zellen durch Ad12-E1A/E1B

Der Kofaktor p300 ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z. B. der Zellzyklusregulation, der Differenzierung oder der Apoptose, beteiligt (Stein *et al.*, 1990; Billion *et al.*, 1996; als Übersicht siehe Goodman und Smolik, 2000; Kolli *et al.*, 2001). Die transkriptionsregulierenden Funktionen von p300 beruhen hierbei zumindest zum Teil auf seiner intrinsischen HAT-Aktivität und der daraus resultierenden Lockerung nukleosomaler Strukturen an Zielpromotoren. Diese Modulation der Chromatinstruktur bewirkt eine erhöhte Zugänglichkeit an der Transkription beteiligter Faktoren zu den entsprechenden Promotorbereichen (als Übersicht siehe Goodman und Smolik, 2000). Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} binden hauptsächlich über den N-Terminus an die C/H3-Domäne von p300 und beeinflussen darüber einige der oben genannten Funktionen (Shikama *et al.*, 1997; Giles *et al.*, 1998; als Übersicht siehe Brockmann *et al.*, 2001).

Die Interaktion von Ad-E1A mit p300 ist für die Umprogrammierung zellulärer Prozesse und für die transkriptionelle Regulation viraler Promotoren sowohl bei der lytischen Infektion als auch bei der Transformation der Wirtszelle essentiell. So ist z. B. die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors abhängig von der Rekrutierung des Ad12-E1A_{12S}-Proteins an das E2-CRE durch die Kofaktoren p300/CBP (Fax *et al.*, 2000). Bei der zellulären Transformation hingegen scheinen die Ad-E1A-Proteine und p300/CBP jedoch gegensätzliche Funktionen zu haben. So konnten Smits und Mitarbeiter (1996) durch Transformationsstudien zeigen, dass eine exogene Überexpression von p300 der Transformation primärer Zellen durch Ad5-E1A/E1B entgegenwirkt.

4.3.1 Eine hohe Expression von Ad12-E1A/E1B in Ad12-E1-transformierten BMK-Zelllinien korreliert mit einer erhöhten endogenen Konzentration des zellulären Kofaktors p300

Die Untersuchung des Einflusses von p300 auf die zelluläre Transformation durch die viralen Genprodukte der Regionen Ad12-E1A und Ad12-E1B erfolgte anhand von Western-Blots mit Proteinextrakten von Zelllinien mit unterschiedlicher Ad12-E1A-Expression. Durch Analyse des Blots mit Antikörpern, die gegen Ad12-E1A, Ad12-E1B-55 kDa und p300 gerichtet sind, wurde die relative Konzentration dieser Proteine in den Zellextrakten bestimmt und

miteinander verglichen (**Abb. 16**). **Abb. 16 C** zeigt den Blot nach Inkubation mit einem p300-spezifischen Antikörper, **Abb. 16 A** mit einem Antikörper, der gegen Ad12-E1A gerichtet ist. In **Abb. 16 B** ist derselbe Blot wie in **Abb. 16 A** nach Behandlung mit einem Ad12-E1B-55 kDa-spezifischen Antikörper dargestellt.

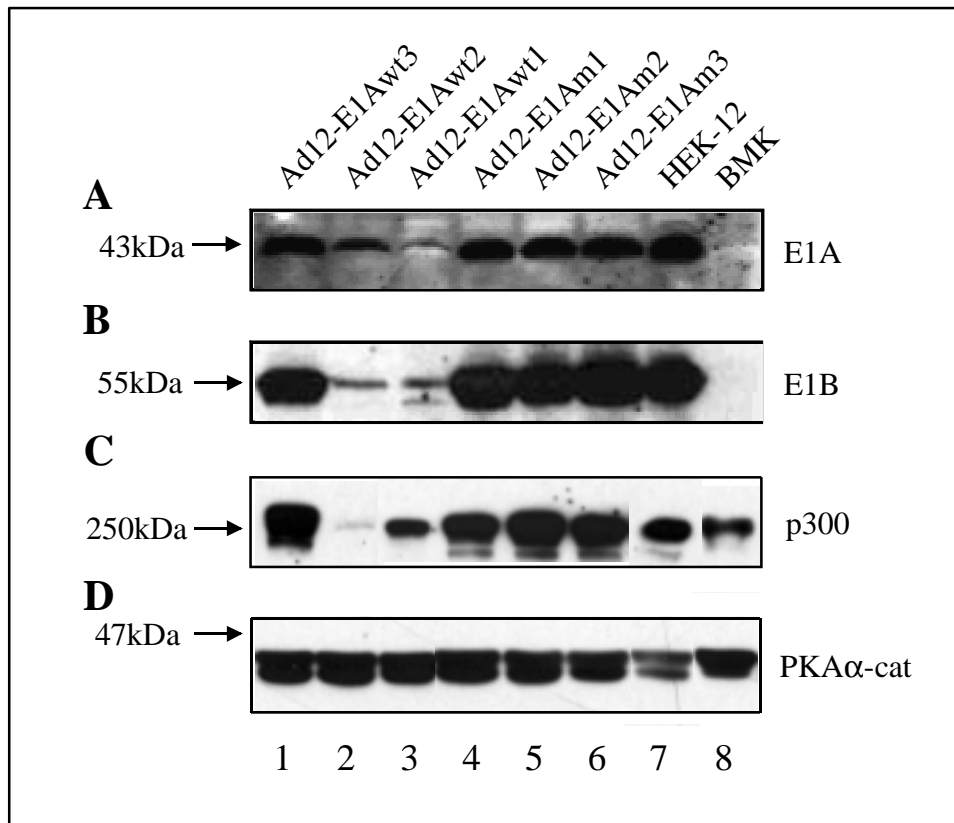


Abb. 16 Vergleich der Expression von Ad12-E1A mit der Konzentration des Koaktivators p300. Je 50 µg Gesamtzellextrakt von Zelllinien mit unterschiedlich hoher Ad12-E1A-Expression wurden durch Western-Blotting mit 12%- (**A**, **B**) bzw. 8%-Polyacrylamidgelen (**C**, **D**) und den rechts angegebenen Antikörpern analysiert. Spuren 1-6: Gesamtzellextrakt der Zelllinien Ad12-E1Awt3 (Spur 1), Ad12-E1Awt2 (Spur 2), Ad12-E1Awt1 (Spur 3), Ad12-E1Am1 (Spur 4), Ad12-E1Am2 (Spur 5) und Ad12-E1Am3 (Spur 6). Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben. (**A**) Western-Blot nach Detektion der Ad12-E1A-Proteine. (**B**) derselbe Blot wie unter (**A**) nach Behandlung mit einem Ad12-E1B-55 kDa-spezifischen Antiserum. (**C**) Western-Blot nach Inkubation mit einem p300-spezifischen Antikörper (C-20). (**D**) derselbe Blot wie unter (**C**) nach Behandlung mit einem Antikörper gegen die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A [PKA/α-cat (C-20)] als Ladungskontrolle. Als Ad12-E1A-Positivkontrolle diente Extrakt von HEK-12-Zellen (Spur 7). Als Ad12-E1A-Negativkontrolle diente Extrakt aus primären BMK-Zellen (Spur 8).

Anhand der Western-Blots wird deutlich, dass in murinen Zelllinien, die eine niedrige Ad12-E1A-Expression aufweisen [Ad12-E1Awt2 (Spur 2), Ad12-E1Awt1 (Spur 3)] oder kein Ad12-E1A exprimieren (BMK, Spur 8), p300 in geringer Konzentration vorliegt. Zelllinien, die Ad12-E1A hoch exprimieren [Ad12-E1Awt3 (Spur 1), Ad12-E1Am1 (Spur 4), Ad12-E1Am2 (Spur 5) und Ad12-E1Am3 (Spur 6)], zeigen hingegen eine hohe p300-

Konzentration. Durch Behandlung desselben Blots mit einem Antikörper, der gegen die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A gerichtet ist (anti-PKA α -cat, **Abb. 16 D**), konnte ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Proteinmengen für unterschiedliche Signalstärken verantwortlich sind. Demnach korreliert in den hier untersuchten transformierten Mauszelllinien eine hohe Ad12-E1A/E1B-Expression mit einer erhöhten p300-Konzentration.

4.3.2 Eine verlängerte Halbwertszeit der p300-Moleküle ist die Ursache für die erhöhte p300-Konzentration in Ad12-E1A hoch-exprimierenden Zelllinien

Ein möglicher Grund für die erhöhte p300-Konzentration in den Ad12-E1A hoch exprimierenden Zelllinien ist die transkriptionelle Aktivierung der p300-Genexpression durch Ad12-E1A. Da semiquantitative Real-Time RT-PCR-Untersuchungen jedoch gezeigt haben, dass die p300-RNA in drei Zelllinien mit unterschiedlicher E1A-Expression in vergleichbarer Konzentration vorliegt (Daten nicht gezeigt), sollte durch Pulse-Chase-Experimente überprüft werden, ob die Halbwertszeit der p300-Moleküle variiert. Zur Bestimmung der Halbwertszeit von p300 in den untersuchten Zelllinien wurden die zellulären Proteine mit ^{35}S -Methionin *in vivo* Puls-markiert und die Zellen anschließend in nicht-radioaktivem DMEM-Vollmedium kultiviert. Von diesen Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proteinextrakte hergestellt und die p300-Proteine mit einem spezifischen Anti-p300 Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine durch Exposition gegen einen Röntgenfilm detektiert. **Abb. 17** zeigt die Fluorogramme der Pulse-Chase-Untersuchungen von Zelllinien mit einer hohen p300-Konzentration (Ad12-E1Awt3, Ad12-E1Am1) im Vergleich mit BMK-Zellen, die im Western-Blot eine geringere p300-Konzentration zeigten (siehe **Abb. 16**). Die Halbwertszeiten von p300 wurden densitometrisch bestimmt und betrugen in BMK-Zellen (**Abb. 17 A**) weniger als 4 h und in den Ad12-E1A hoch exprimierenden Zelllinien Ad12-E1Awt3 (**Abb. 17 B**) und Ad12-E1Am1 (**Abb. 17 C**) ca. 16 h (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass eine hohe Konzentration von Ad12-E1A und Ad12-E1B mit einer ebenfalls erhöhten Halbwertszeit von p300 in den untersuchten Mauszelllinien korreliert. Diese Ergebnisse lassen zudem darauf schließen, dass eine hohe Konzentration von p300 der zellulären Transformation durch Ad12-E1A/E1B nicht per se entgegenwirkt.

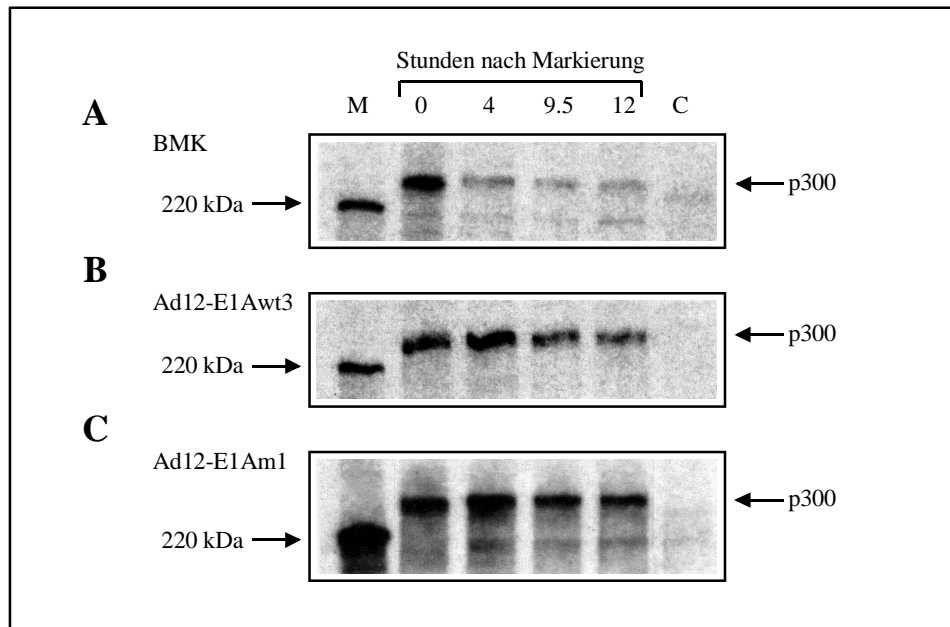


Abb. 17 Pulse-Chase-Untersuchungen zur Bestimmung der Halbwertszeit von p300. Primäre BMK-Zellen (A) sowie Zellen von Zelllinien mit einer hohen Ad12-E1A/E1B-Expression [Ad12-E1Awt3 (B), Ad12-E1Am1 (C)] wurden mit 300 μ Ci 35 S-Methionin/ml DMEM 1 h Puls-markiert, anschließend in nicht-radioaktivem DMEM-Vollmedium kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die p300-Proteine wurden mit einem spezifischen Anti-p300-Antiserum (N-15) präzipitiert und die Präzipitate über 6% Acrylamidgele aufgetrennt. Die Gele wurden fixiert, mit Verstärkerlösung (Amplify) behandelt und getrocknet. Die Detektion der p300-spezifischen Banden erfolgte durch Exposition gegen Röntgenfilme. Die Intensität der Banden wurde mit Hilfe eines Laser-Densitometers bestimmt und dabei Halbwertszeiten von weniger als 4 h für BMK-Zellen (A) und ca. 16 h für die Zelllinien Ad12-E1Awt3 und Ad12-E1Am1 ermittelt (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Die p300-Konzentration in der niedrig Ad12-E1A-exprimierenden Zelllinie Ad12-E1Awt2 wird durch die Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG-132 erheblich gesteigert

Aus Studien von Poizat und Mitarbeitern (2000) geht hervor, dass p300-Moleküle in Ratten-Kardiozyten durch die Proteasomen der Zelle abgebaut werden. Daher sollte in nachfolgenden Untersuchungen durch Einsatz des Proteasomeninhibitors MG-132, der spezifisch die 26S-Untereinheit des proteasomalen Komplexes inhibiert, analysiert werden, ob p300 in den transformierten Mauszelllinien auf dem gleichen Weg degradiert wird. Zellen der Ad12-E1A/E1B niedrig exprimierenden Zelllinie Ad12-E1Awt2 wurden über einen Zeitraum von 24 h in DMEM-Vollmedium mit 0,5 μ M MG-132 inkubiert und geerntet. Die Proteinextrakte behandelter und unbehandelter Zellen wurden anschließend durch Western-Blotting analysiert. **Abb. 18** zeigt, dass die p300-Konzentration in der Zelllinie Ad12-E1Awt2 durch

die Behandlung mit MG-132 um ein Vielfaches gesteigert werden kann (vergleiche Spur 1 und 2). Diese Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse der Pulse-Chase-Untersuchungen, die zeigen, dass die erhöhte Konzentration von p300 in hoch Ad12-E1A/E1B-exprimierenden Zellen die Folge einer erhöhten Halbwertszeit und damit einer erhöhten Proteininstabilität ist. Zusammen mit den Daten der Western-Blot Untersuchungen (siehe **Abb. 16**) deutet dies zudem darauf hin, dass der proteasomale Abbau von p300 durch eine hohe Expression von Ad12-E1A/E1B effizient inhibiert werden kann.

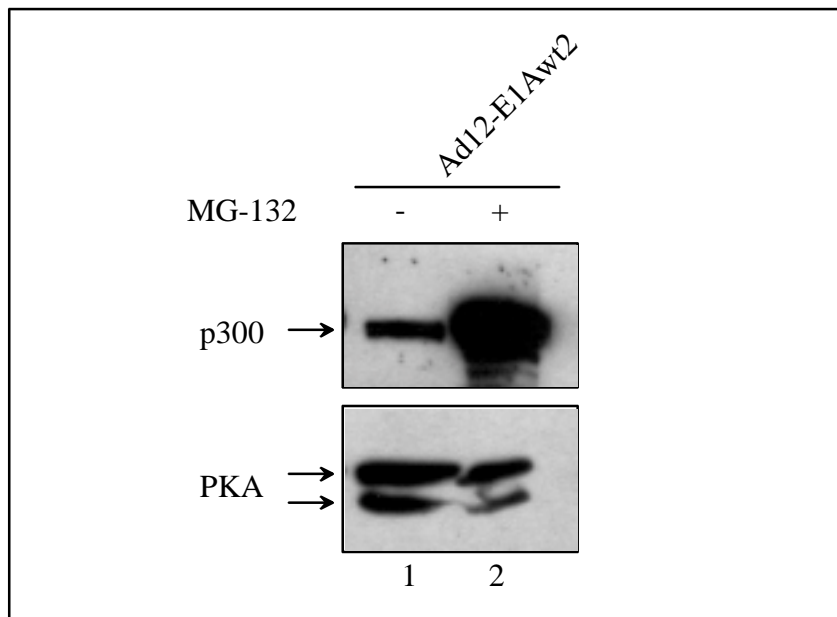


Abb. 18 Einfluss des Proteasomeninhibitors MG-132 auf die endogene Konzentration des zellulären Kofaktors p300 in der Zelllinie Ad12-E1Awt2. Zellen der Zelllinie Ad12-E1Awt2 wurden 24 h mit 0,5 μ M MG-132 (+, Spur 2) oder mit dem gleichen Volumen des verwendeten Lösungsmittels DMSO (-, Spur 1) behandelt. Nach der Ernte der Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt, 70 μ g jeden Extrakts auf einem 8% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die p300-Proteine wurden mit einem spezifischen Anti-p300-Antikörper (N-15) detektiert. Als Auftragungsskontrolle wurde derselbe Blot mit einem Antikörper, der gegen PKA α -cat (C-20) gerichtet ist, analysiert. Die Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch Einsatz spezifischer HPO-gekoppelter Sekundärantikörper und einem Chemolumineszenzsubstrat detektiert.

4.3.4 Die Expression von Ad12-E1A in Ad12-infizierten C33A-Zellen korreliert mit einer Erhöhung der p300-Konzentration

Die bis zu diesem Zeitpunkt ermittelten Daten aus den Pulse-Chase-Untersuchungen und der Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG-132 lassen vermuten, dass eine hohe Expression von Ad12-E1A/E1B in Ad12-E1-transformierten BMK-Zellen eine Stabilisierung von p300 hervorrufen kann. Durch Infektion permissiver Zellen mit Ad12-Viren sollte nun

überprüft werden, ob die Expression von Ad12-E1A/E1B auch im Verlauf der Infektion eine Erhöhung der p300-Konzentration bewirkt. Dazu wurden Zellen der humanen Cervix-Karzinomzelllinie C33A ausgewählt, da sie keine Sequenzen humaner Papillomaviren enthalten (siehe z. B. Crook *et al.*, 1991). Die Gefahr einer Einflussnahme anderer viraler Proteine als der von Ad12 auf die p300-Konzentration wurde somit deutlich reduziert. Nach der Infektion wurden die Zellen in DMEM-Vollmedium kultiviert, zu bestimmten Zeitpunkten geerntet und Proteinextrakte hergestellt. **Abb. 19** zeigt Western-Blot-Untersuchungen mit Extrakten aus Ad12-infizierten C33A-Zellen nach Inkubation mit spezifischen Antiseren, die gegen Ad12 E1A (**A**), Ad12-E1B-55 kDa (**B**) oder p300 (**C**) gerichtet sind. Die Expression von Ad12-E1A kann 8 h nach Infektion der Zellen gut detektiert werden (**Abb. 19 A**, Spur 3). Eine Ad12-E1B-Expression wurde dagegen erst zum Zeitpunkt der darauffolgenden Messung, ca. 23 h nach Infektion, beobachtet. Die zeitliche Verzögerung resultiert vermutlich aus der Abhängigkeit des E1B_{Ad12}-Promotors von der transkriptionellen Aktivierung durch das Ad12-E1A_{13S}-Protein (Moran *et al.*, 1986). Die Analyse gleicher Proteinmengen wurde durch Untersuchung mit einem Anti-PKA α -cat-Antikörper sichergestellt (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise korreliert in C33A-Zellen die Expression von Ad12-E1A ca. 8 h nach Infektion mit einer ebenfalls erhöhten Konzentration von p300 (**Abb. 19 C**, Spur 3). Mit zunehmender Ad12-E1B-Expression nimmt die p300-Konzentration wieder ab und fällt 48 h nach Infektion unter den Wert nicht infizierter Zellen (**Abb. 19 C**, Spur 6 und 7). Die Reduktion der p300-Konzentration spät nach der Infektion resultiert wahrscheinlich aus der Blockade der Akkumulation zellulärer mRNA im Zytoplasma Adenovirus-infizierter Zellen durch die Ad-E1B- und Ad-E4-34 kDa-Polypeptide (Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986) sowie der zu diesem Zeitpunkt bereits einsetzenden Zelllyse. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Western-Blot-Untersuchungen in Abschnitt **4.3.1**, die bereits gezeigt hatten, dass in Ad12-E1A/E1B-transformierten BMK-Zelllinien eine erhöhte p300-Konzentration mit einer hohen Ad12-E1A- oder Ad12-E1B-Expression korreliert. Zudem ist aufgrund der Ergebnisse anzunehmen, dass die erhöhte p300-Konzentration nicht die Folge der Expression von Ad12-E1B ist, da die p300-Konzentration bereits zu einem Zeitpunkt ansteigt, zu dem noch keine Ad12-E1B-Expression detektierbar ist (**Abb. 19**, Spur 3). Da die Erhöhung der p300-Konzentration 8 h nach Infektion zeitgleich mit dem Einsetzen der Ad12-E1A-Expression erfolgt (siehe **Abb. 19**, Spur 3) ist es wahrscheinlich, dass die erhöhte p300-Konzentration die Folge einer Stabilisierung durch die Ad12-E1A-Proteine ist.

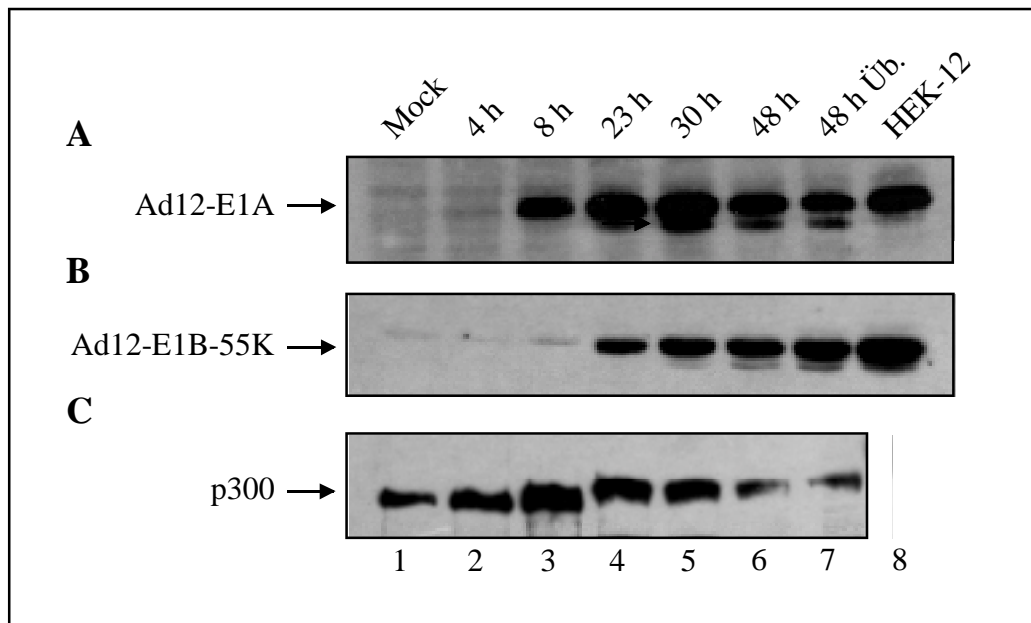


Abb. 19 Bestimmung der p300-Konzentration in Ad12-infizierten C33A-Zellen. C33A-Zellen wurden mit Ad12-Viren infiziert, die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Proteinextrakte hergestellt. Jeweils 50 µg Extrakt wurden entweder auf 12%- (A, B) oder 6%- (C) Polyacrylamidgelen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blotting auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden mit Antiseren gegen Ad12-E1A (A), Ad12-E1B-55 kDa (B) und p300 (C) behandelt. Spur 1 zeigt Extrakt nicht infizierter Zellen (Mock), die Spuren 2-7 zeigen Extrakte Ad12-infizierter C33A-Zellen. Spur 6 zeigt Zellen, die 48 h nach Infektion noch adhären wuchsen, und Spur 7 Zellen, die sich zum gleichen Zeitpunkt bereits von dem Zellkulturgefäß abgelöst hatten. Spur 8 zeigt Extrakt von HEK-12-Zellen als Ad12-E1A/E1B-Positivkontrolle.

5 Diskussion

Zur Aufklärung der Mechanismen der zellulären Transformation und der Tumorentstehung stellen Adenovirus-Wirtszellsysteme ein hervorragendes Modell dar. Die unterschiedliche Onkogenität der verschiedenen Adenovirus-Serotypen im nicht-permissiven System ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Da ausschließlich die Herkunft der E1A-Region für die Onkogenität von Adenoviren verantwortlich ist (Bernards *et al.*, 1983), müssen die E1A-Proteine onkogener Ad-Serotypen für die Onkogenität relevante Funktionen ausüben, die von den nicht-onkogenen Serotypen nicht erfüllt werden können. Die vergleichende Analyse von Zelllinien, die jeweils unterschiedliche Spektren an Ad12-E1A-Proteinen exprimieren, sollte daher der Aufklärung onkogener Mechanismen in transformierten Zellen dienen. Zu diesem Zweck wurde eine Punktmutation in die Ad12-E1A-Region eingefügt, die zum Verlust der Spleißvarianten Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} führt, die putative onkogene Determinanten darstellen. Anschließend wurden Zelllinien etabliert, die entweder durch die Ad12-E1Awt-Region oder die Ad12-E1A-Mutante jeweils in Kombination mit Ad12-E1B transformiert sind. Durch die Charakterisierung dieser Zelllinien *in vitro* und *in vivo* konnte ich im Wesentlichen zeigen:

1. dass die Expression des Ad12-E1A_{13S}-Proteins in Kooperation mit Ad12-E1B für die Transformation primärer BMK-Zellen ausreicht. Die Ad12-E1Am- und die Ad12-13S-Zelllinien zeigen jedoch neben einer verlängerten Latenzzeit bis zur Induktion eines Tumorwachstums in Nacktmäusen eine deutlich reduzierte Onkogenität in immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen.
2. dass im Fall der Ad12-E1Awt-Zelllinien die zelluläre MHC-Klasse-I-Expression stärker reduziert ist als bei den Ad12-E1Am-Zelllinien,
3. dass die endogene Konzentration des zellulären Kofaktors p300 in Ad12-E1-transformierten Zelllinien mit einer hohen Expression der Ad12-E1A- und Ad12-E1B-Proteine gegenüber Zelllinien mit einer niedrigen Ad12-E1A/E1B-Expression erhöht ist. Die erhöhte Konzentration ist die Folge einer verlängerten Halbwertszeit der p300-Moleküle in den hoch E1A-exprimierenden Zelllinien.

5.1 Die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} sind für die Transformation durch Ad12-E1A nicht essentiell

Die Untersuchung transformierter BMK-Zelllinien, die unterschiedliche Ad12-E1A-Konstrukte exprimieren, sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit distinkte Ad12-E1A-Genprodukte für die Transformation und die Onkogenität von Ad12 essentiell sind. Die Weichagartests sowie die Tumorinduktionsstudien an Nacktmäusen verdeutlichen, dass die von dem Ad12-E1Am-Konstrukt exprimierten Ad12-E1A-Proteine Ad12-E1Am_{13S} und Ad12-E1Am_{12S} in Kooperation mit Ad12-E1B für die Transformation primärer Zellen durch Ad12-Genprodukte ausreichend sind. Dass auch das Ad12-E1A_{12S}-Protein zur vollständigen Transformation primärer Zellen nicht benötigt wird, ergaben Untersuchungen einer Zelllinie, die ausschließlich eine Ad12-13S-cDNA exprimiert. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Lamberti und Williams (1990), die zeigen, dass Ad12-Viren, die als Folge einer Punktmutation das Ad12-E1A_{12S}-Protein nicht mehr exprimieren, primäre BRK- und BMK-Zellen wie Ad12-Wildtypviren transformieren.

Die Ad12-13Sm-Zelllinien, die nur das Ad12-E1Am_{13S}-Protein und Ad12-E1B exprimieren, waren dagegen in 2 von 3 Fällen nur mit sehr geringer Effizienz in der Lage, in Weichagar Klone zu bilden. Durch RT-PCR-Untersuchungen wurde in der Zelllinie Ad12-13Sw3 die Prozessierung der Ad12-10S-mRNA nachgewiesen, die in den Ad12-13Sm-Zelllinien aufgrund der Punktmutation nicht auftritt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen die Spekulation zu, dass in Ad12-E1A/E1B-transformierten Zelllinien, die das Ad12-E1A_{12S}-Protein nicht exprimieren, dem Ad12-E1A_{10S}-Protein eine wichtige Funktion bei der Transformation zukommt. Im Fall der Proteine Ad12-E1Am_{13S} und Ad12-E1Am_{12S} ist jedoch nicht auszuschließen, dass der durch die eingefügte Punktmutation hervorgerufene Aminosäureaustausch einen teilweisen Funktionsverlust der Proteine bewirkt und daher für das reduzierte transformierende Potential der Ad12-E1Am- und Ad12-13S-Zelllinien verantwortlich ist (siehe auch Abschnitt 5.2).

5.2 Die Expression der Ad12-E1Awt-Region führt zu einer verkürzten Latenzzeit bei der Tumorinduktion in Nacktmäusen

Mit Ausnahme der Zelllinien Ad12-E1Awt3 und Ad12-E1Am4 waren alle Ad12-E1A/E1B-transformierten BMK-Zelllinien in der Lage, in Nacktmäusen Tumoren zu bilden. Verglichen mit den Ad12-E1Awt-Zelllinien zeigten die Ad12-E1Am-, die Ad12-13Swt- und die Ad12-13Sm-Zelllinien jedoch eine zum Teil deutlich verlängerte Latenzzeit. Die Ursache hierfür ist zur Zeit nicht klar. Da sich die Ad12-E1Am-Zelllinien nur durch den Verlust der Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} von den Ad12-E1Awt-Zelllinien unterscheiden, spricht dies für eine wichtige Funktion von Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} bei der Transformation primärer Zellen durch Ad12-E1A. Da die Zelllinie Ad12-13Swt3 neben der Ad12-E1A-13S-mRNA auch die Ad12-E1A-10S-mRNA prozessiert (Daten nicht gezeigt), scheint es, dass der Verlust des Ad12-E1A_{12S}- und/oder des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins der Grund für die verlängerte Latenzzeit ist. Die Tatsache, dass die Ad12-13Sm-Zelllinien zum Teil nur mit sehr geringer Effizienz Weichagarklone bilden und erst nach erheblich verlängerter Latenz in Nacktmäusen zu Tumoren auswachsen, zeigt wiederum, dass die Expression von Ad12-E1Am_{12S} im Fall der Ad12-E1Am-Zelllinien eine effizientere Transformation bewirkt, da sich die Ad12-E1Am- und die Ad12-13Sm-Zelllinien nur durch die Expression des Ad12-E1A_{12S}-Proteins unterscheiden. Im Fall der Zelllinie Ad12-13Swt3 korreliert die Expression von Ad12-E1A_{10S} zusätzlich zu Ad12-E1A_{13S} mit einer verkürzten Latenz gegenüber den Ad12-13Sm-Zelllinien. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass Ad12-E1A-Proteine, wie z. B. Ad12-E1A_{12S} und Ad12-E1A_{9,5S}, bei der zellulären Transformation zumindest teilweise redundante Funktionen ausüben.

Neben der deutlich verlängerten Latenzzeit bei der Tumorinduktion durch die Ad12-13Sm-Zelllinien konnte in einigen Ad12-13Sm-induzierten Tumoren unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Ad12-E1Am_{13S}-Expression nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür konnte im Fall der Zelllinie Ad12-13Sm3 durch PCR-Analysen auf den Verlust der Ad12-13S-DNA-Sequenzen zurückgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Da im Fall dieser Tumoren fraglich ist, ob eine Korrelation zwischen der Tumorbildung und der Expression von Ad12-E1Am_{13S} besteht, deuten diese Ergebnisse ebenfalls darauf hin, dass das Ad12-E1Am_{13S}-Protein alleine in Kombination mit Ad12-E1B primäre BMK-Zellen nur mit sehr geringer Effizienz transformieren kann.

Transformationsstudien an den nicht-onkogenen Ad-Serotypen 2 und 5 ergaben, dass das Ad5-E1A_{12S}-Protein für die onkogene Transformation primärer Zellen durch Ad2/5-Genprodukte essentiell ist (Montell *et al.*, 1984; Hurwitz und Chinnadurai, 1985; Moran *et al.*, 1986). Im Gegensatz hierzu zeigen meine Daten, dass im Fall des hoch-onkogenen Ad12 das Ad12-E1A_{12S}-Protein in Kombination mit Ad12-E1B für die vollständige Transformation von BMK-Zellen nicht benötigt wird. Die verlängerte Latenzzeit bis zur Tumorinduktion in Nacktmäusen durch die Zelllinie Ad12-13Swt3 deutet jedoch darauf hin, dass die gleichzeitige Expression des Ad12-E1A_{12S}-Proteins ein aggressiveres Tumorstadium im Tier bewirkt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass transformationsrelevante Ad-E1A-Funktionen, wie z. B. die Dissoziation inhibitorischer pRB/E2F-Komplexe (siehe z. B. Sidle *et al.*, 1996) oder die Interaktion mit p300 (Eckner *et al.*, 1994; als Übersicht siehe Brockmann *et al.*, 2001), durch die konservierten Regionen 1 und 2 sowie den N-Terminus vermittelt werden. Die Transformation durch Ad12-E1A ist also zu einem großen Teil von Domänen abhängig, die auch im Ad12-E1A_{12S}-Protein lokalisiert sind. Da in transienten Expressionsstudien unterschiedliche Funktionen von Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S}, z. B. im Fall des GPH- α -Promotors, nachgewiesen wurden (Pestell *et al.*, 1996), könnte man spekulieren, dass die Proteine Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} nicht komplementierbare Funktionen ausüben und daher nur durch die gleichzeitige Expression beider Proteine eine effiziente Transformation der Zelle erfolgt.

Interessanterweise wurde bei den PCR-Untersuchungen genomischer DNA keine transformierte Zelllinie identifiziert, die eine Ad12-E1A_{12S}-cDNA neben der Ad12-E1B-Region integriert hat. Da davon ausgegangen werden muss, dass die Produzentenzelllinie Ω E auch rekombinante Retroviren mit einer Ad12-E1A_{12S}-RNA generiert (siehe z. B. Cepco *et al.*, 1984), ist anzunehmen, dass das Ad12-E1A_{12S}-Protein in Kombination mit Ad12-E1B für die Transformation primärer BMK-Zellen nicht ausreicht. Auch diese Daten decken sich mit denen anderer Autoren, die durch Infektion primärer Zellen mit Ad12-Virusmutanten, die das Ad12-E1A_{13S}-Protein nicht exprimieren, keine transformierten Zelllinien etablieren konnten (Lamberti und Williams, 1990). Da in diesen Analysen die Ad12-E1B-Expression in Abhängigkeit vom Zellsystem zu einem gewissen Grad durch das Ad12-E1A_{13S}-Protein gesteuert wird, ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Verlust des transformierenden Potentials der Ad12-E1A-Mutante bei diesen Studien durch eine unzureichende Ad12-E1B-Expression hervorgerufen wurde. Da in den von mir verwendeten transformierten BMK-Zelllinien die Ad12-E1B-Expression von den Ad12-E1A-unabhängigen retroviralen LTR-Sequenzen reguliert wird, ist in meinen Experimenten eine unzureichende Ad12-E1B-

Expression als Ursache für das Fehlen Ad12-E1A_{12S}/E1B-transformierter Zelllinien auszuschließen.

Untersuchungen unterschiedlicher Autoren (Zerler *et al.*, 1986; Schneider *et al.*, 1987; Whyte *et al.*, 1988B) haben gezeigt, dass für die Transformation primärer Zellen durch Ad-E1A in Kombination mit aktiviertem Ras lediglich die Aminosäuren 1-127 von Ad-E1A benötigt werden. In Kombination mit Ras sollte demnach das Ad-E1A_{12S}-Protein für die Transformation primärer Zellen ausreichen. Da im Zuge meiner Untersuchungen keine Ad12-E1A_{12S}/E1B-transformierte Zelllinie isoliert werden konnte, muss man davon ausgehen, dass für die Transformation primärer Zellen durch Ad12-E1A in Kombination mit Ad12-E1B die ausschließlich im Ad12-E1A_{13S}-Protein vorkommende CR3 essentiell ist. Demnach wäre die Fähigkeit von CR3, durch Interaktion mit generellen Transkriptionsfaktoren und Mediatorkomplexen (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995; Flint und Shenk, 1997; Berk *et al.*, 1998; Gallimore und Turnell, 2001) bestimmte zelluläre Promotoren zu aktivieren, für eine effektive Transformation primärer Zellen durch Ad12-E1A/E1B unverzichtbar. Möglich ist auch, dass durch die Helferzelllinie Ω E wesentlich weniger rekombinante Retroviren mit einer Ad12-E1A_{12S}-RNA als mit einer Ad12-E1A_{13S}-RNA in infektiöse Partikel verpackt wurden. Zusammen mit einem wesentlich geringeren transformierenden Potential des Ad12-E1A_{12S}-Proteins hätte dies eine sehr geringe Anzahl an Ad12-E1A_{12S}/E1B-Transformanden zur Folge, die dann unter den gegebenen Bedingungen nicht isoliert werden konnten. Eine andere Erklärung für die Tatsache, dass keine Ad12-E1A_{12S}/E1B-transformierten Zelllinien isoliert wurden, ist, dass die Transformation durch Ad12-E1A_{12S} ein sehr seltenes Ereignis ist und daher unter den insgesamt 31 analysierten Klonen keine Ad12-E1A_{12S}/E1B-transformierte Zelllinie vorhanden war.

5.3 Nur die Ad12-E1Awt-Zelllinien bilden mit hoher Effizienz Tumoren in immunkompetenten syngen Tieren

Von besonderem Stellenwert waren neben den Transformationsstudien in Nacktmäusen die Tumorinduktionsversuche in immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen. Anhand dieser Studien sollte die Funktion der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} bei der onkogenen Transformation im Mausmodell analysiert werden. Die Zelllinien Ad12-E1Awt1 und Ad12-E1Awt2 bildeten bereits nach wenigen Tagen in jeweils 9 von 9 injizierten Tieren Tumoren. Interessanterweise war von den 3 charakterisierten Ad12-E1Am-Zelllinien nur

Ad12-E1Am2 in der Lage, bei Injektion von 1×10^7 Zellen in 2 von 6 Fällen bzw. bei Injektion von 5×10^7 Zellen in 2 von 3 Fällen nach einer verlängerten Latenzzeit ein Tumorwachstum in BALB/c-Mäusen zu induzieren. Die Ad12-13S-Zelllinie Ad12-13Swt3 bildete bei Injektion von 5×10^7 Zellen in keiner von 3 Mäusen einen Tumor. Diese Daten zeigen, dass die Ad12-E1Awt-Zelllinien ein deutlich höheres onkogenes Potential in immunkompetenten Tieren besitzen als die Ad12-E1Am- und die Ad12-13S-Zelllinien. Die erhöhte Onkogenität der Ad12-E1Awt-Zelllinien korreliert wiederum mit der Fähigkeit zur Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S}. Es ist daher wahrscheinlich, dass eines dieser Ad12-E1A-Proteine eine neue onkogene Determinante der E1A-Region von Ad12 darstellt. Die Tatsache, dass die Zelllinie Ad12-13Swt3 trotz der Fähigkeit zur Expression des Ad12-E1A_{10S}-Proteins keinen Tumor in immunkompetenten Tieren bilden konnte, lässt vermuten, dass das Protein Ad12-E1A_{9,5S} alleine oder die Kombination aus Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} für die Onkogenität von Ad12-E1A mit verantwortlich ist.

Aufgrund der verlängerten Latenzzeit bis zur Tumorinduktion in Nacktmäusen ist es möglich, dass die Ad12-E1Am- im Vergleich zu den Ad12-E1Awt-Zelllinien generell eine verminderte Fähigkeit zur Tumorbildung *in vivo* haben. Als Ursache für die fehlende Onkogenität der Zelllinien Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am3 in immunkompetenten syngen Tieren ist dies aus zwei Gründen jedoch nicht wahrscheinlich: (I) Beide Zelllinien bildeten Klone in Weichagar und induzierten Tumoren in Nacktmäusen mit vergleichbarer Effizienz wie die Ad12-E1Awt-Zelllinien. (II) Auch aus Nacktmaustumoren rekultivierte Zellen dieser Zelllinien, die durch die Nacktmaus-Passage auf Transformation selektiert worden waren, bildeten keine Tumoren in BALB/c-Mäusen. Daher müssen andere Gründe, wie z. B. eine reduzierte Fähigkeit zur Suppression der zellulären Immunantwort, für die deutlich geringere Onkogenität der Ad12-E1Am-Zelllinien verantwortlich sein.

5.4 Die Onkogenität der transformierten BMK-Zelllinien korreliert mit einer unterschiedlich hohen Dichte an MHC-Klasse-I-Molekülen auf Ad12-E1Awt- und Ad12-E1Am-Zelllinien

Als eine der Hauptursachen für die Onkogenität von Ad12 wird die reduzierte MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche Ad12-transformierter Zellen diskutiert. Die transformierten Zellen können so dem Immunsystem des Wirtsorganismus entkommen und im immunkompetenten syngenem Tier ein Tumorwachstum induzieren (Bernards *et al.*, 1983, Schrier *et al.*, 1983, Eager *et al.*, 1985). Eine Erklärung für die reduzierte Onkogenität der Ad12-E1Am-Zelllinien ist demnach eine unzureichende Repression der MHC-Klasse-I-Expression und die daraus resultierende Eliminierung der Zellen durch die CTLs des Wirtstiers. Die FACS-Analysen mit einem MHC-Klasse-I-H2-k^d-spezifischen Antikörper haben gezeigt, dass die MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche der Ad12-E1Awt-Zelllinien stärker reduziert ist als auf den Ad12-E1Am-Zelllinien. Diese Daten verdeutlichen, dass Ad12-E1A_{13S} alleine die MHC-Klasse-I-Expression in transformierten BMK-Zellen nicht in dem Maße reduzieren kann, dass diese Zellen einen onkogenen Phänotyp ausbilden. Da neben dem Ad12-E1A_{13S}- auch das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein den MHC-Klasse-I-Promotor in transienten Expressionsstudien reprimiert (Brockmann *et al.*, 1996), ist es möglich, dass das Fehlen des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins der Grund für die reduzierte Onkogenität der Ad12-E1Am-transformierten Zelllinien ist. Diese Ergebnisse stützen unsere Hypothese, dass neben dem Ad12-E1A_{13S}-Protein ein weiteres Ad12-E1A-Protein zur Repression des MHC-Klasse-I beiträgt (siehe auch Abschnitt 1.2.4). Für eine Beteiligung von Ad12-E1A_{9,5S} an der Onkogenität der Ad12-E1A-Region sprechen indirekt auch die Daten von Telling und Williams (1994) sowie Jelinek *et al.* (1994), die die sog. Spacer-Region zwischen CR2 und CR3 als onkogene Determinante identifizierten. Durch die Deletion des Spacers geht gleichzeitig das Leseraster für den C-Terminus des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins verloren. Folglich kann die verminderte Onkogenität der Spacer-Deletionsmutanten ebenfalls auf den Verlust des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins zurückgeführt werden.

Obwohl die Daten aus den FACS-Analysen vermuten lassen, dass das Fehlen des Ad12-spezifischen Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins für die reduzierte Onkogenität der Ad12-E1Am-Zelllinien verantwortlich ist, konnte durch seine nachträgliche exogene Expression als N-terminal getaggtetes 6 x Myc-Fusionsprotein in jeweils zwei der Ad12-E1Am-Zelllinien keine weitere, durch FACS-Analysen detektierbare Reduktion der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass ein manifestierter Phänotyp

bei Virus-transformierten Zellen durch nachträgliche Expression eines anderen viralen Gens nicht verändert werden kann, ist jedoch ein generelles Phänomen bei der Untersuchung adenoviraler Zellsysteme (siehe z. B. Vaessen *et al.*, 1986). Möglicherweise kommt dem Ad12-E1A_{9,5S}-Protein aber auch während des zellulären Transformationsprozesses eine essentielle Funktion bei der Repression der MHC-Klasse-I-Expression zu, so dass eine nachträgliche Expression in bereits etablierten Zellen keine weitere Reduktion von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche bewirken kann. Zu diesen putativen Funktionen ist zu zählen, dass die Expression von Ad12-E1A_{9,5S} wie im Fall der Ad-E4-Proteine E4orf6 und E4orf3 bei der sog. „Hit and Run“ Transformation (Nevels *et al.*, 2001) hauptsächlich in der frühen Phase der Transformation von Bedeutung ist, in etablierten Zelllinien jedoch nicht mehr benötigt wird.

Um die Funktion des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins in der frühen Phase der Transformation zu analysieren, können zukünftig primäre Zellen durch Kotransfektion von cDNAs der Proteine Ad12-E1A_{13S} und/oder Ad12-E1A_{12S} und dem Ad12-E1A_{9,5S}-6 x Myc-Konstrukt zusammen mit Ad12-E1B transformiert werden. Durch Bestimmung der MHC-Klasse-I-Expression auf den so generierten Zelllinien kann dann geschlossen werden, ob das Ad12-E1A_{9,5S}-Protein bereits im Verlauf des Transformationsprozess eine entscheidende Funktion bei der Repression der MHC-Klasse-I-Expression ausübt.

Fasst man diese Daten zusammen, könnte man schlussfolgern, dass nicht das Ad12-E1A_{9,5S}-, sondern das Ad12-E1A_{10S/11S}-Protein oder die Punktmutation in den Proteinen Ad12-E1Am_{13S} und Ad12-E1Am_{12S} für die unvollständige Repression der MHC-Klasse-I-Expression sowie für die verringerte Tumorigenität verantwortlich ist. Diesen Annahmen widersprechen jedoch folgende Tatsachen: (I) Im Gegensatz zu dem Ad12-E1A_{9,5S}-Protein kann Ad12-E1A_{10S/11S} den MHC-Klasse-I-Promotor in transienten Studien nicht reprimieren (pers. Mitteilung D. Brockmann). (II) Die Punktmutation in Ad12-E1Am_{13S} und Ad12-E1Am_{12S} führt lediglich zu einem konservativen Austausch von Valin zu Leucin. Im Fall der vorgenannten Proteine hat dieser Aminosäureaustausch zudem keinen Einfluss auf die untersuchten transregulatorischen Funktionen wie die Repression eines colTRE-abhängigen Reporterkonstrukts oder die Aktivierung des humanen *c-jun* Promotors (Promotion C. Hauptenthal, 1997, Daten nicht gezeigt). (III) Aus aktuellen Studien geht hervor, dass die Bildung des transformationsrelevanten Komplexes aus Ad-E1A und dem zellulären Faktor p400 über die Aminosäuren 25-36 von Ad5 verläuft (Fuchs *et al.*, 2001). Die Punktmutation in dem Ad12-E1Am-Konstrukt überführt die Ad12-Sequenz in die E1A-Sequenz von Ad5 in dem betroffenen Bereich. Daher ist anzunehmen, dass die Interaktion von Ad12-E1A mit

p400 durch diese Punktmutation nicht negativ beeinflusst wird. (IV) Im Fall des Ad12-E1A_{13S}-Proteins wird die Repression der MHC-Klasse-I-Expression durch CR3 vermittelt (Bernards *et al.*, 1983; Vaessen *et al.*, 1986; Meijer *et al.*, 1992). Diese Region ist von der eingefügten Punktmutation nicht betroffen. Man kann daher davon ausgehen, dass das Fehlen des Ad12-E1A_{9,5S}-Proteins für die unvollständige Repression der MHC-Klasse-I-Repression bei den Ad12-E1Am-Zelllinien und somit möglicherweise auch für deren reduzierte Onkogenität verantwortlich ist.

Auf Zellen der Zelllinie Ad12-E1Am2, die durch Rekultivierung eines BALB/c-Tumors gewonnen worden waren (Ad12-E1Am2Re), wurde durch FACS-Analysen eine ähnliche hohe Dichte an MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche wie auf den Ursprungszellen detektiert. Die Tumorbildung im Fall dieser Zelllinie ist demnach wahrscheinlich nicht darauf zurückzuführen, dass im Tier eine Ad12-E1Am2-Subpopulation mit einer reduzierten MHC-Klasse-I-Expression ausgewachsen ist. Es wäre ebenso denkbar, dass die verringerte Fähigkeit zur Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression durch die Genprodukte des Ad12-E1Am-Konstrukts für eine Tumorinduktion in immunkompetenten syngeneten Tieren ausreicht. Gegen diese Annahme spricht jedoch die deutlich reduzierte Onkogenität der Zelllinie Ad12-E1Am2 sowie der nicht-onkogene Phänotyp der Zelllinien Ad12-E1Am1 und Ad12-E1Am3, die eine mit Ad12-E1Am2 vergleichbare MHC-Klasse-I-Expression zeigen. In Untersuchungen von Haddada und Mitarbeitern (1986) wurde eine Zelllinie beschrieben (Ad2HE3ATL-1), die nach mehrmaliger Passage in immundefizienten Tieren trotz hoher MHC-Klasse-I-Expression Tumoren in immunkompetenten Tieren erzeugt. Die parentale Zelllinie (Ad2HE3) hingegen ist nicht onkogen. Da beide Zelllinien vergleichbare Mengen an MHC-Klasse-I-Molekülen exprimieren, ist anzunehmen, dass im Fall von Ad2HE3ATL-1 die Erkennung der Zellen durch das Immunsystem des Wirtstiers auf anderem Wege verhindert wird. Es ist z. B. denkbar, dass das im Normalfall präsentierte virusspezifische Antigen wegen einer zu geringen Expression in der Zelle nicht in ausreichender Menge vorhanden ist oder aufgrund einer Mutation nicht mehr effektiv prozessiert wird. Zudem wird diskutiert, dass von Ad-infizierten/transformierten Zellen je nach Ad-Serotyp unterschiedliche Antigene präsentiert werden (als Übersicht siehe Williams *et al.*, 1995). Studien von Föhring und Mitarbeitern (1983) ergaben, dass das Epitop von Ad12, das *in vitro* von CTLs erkannt wird, ein Genprodukt der Ad12-E1B-Region darstellt. Sollte nun das Ad12-E1B-19 kDa-Protein das bevorzugt präsentierte Antigen sein, so könnte die schwache Onkogenität von Ad12-E1Am2 auch auf eine unzureichende Ad12-E1B-19 kDa-Expression zurückgeführt werden. Western-Blot-Analysen mit einem

Ad12-E1B-19 kDa-spezifischen Antikörper sollen in zukünftigen Untersuchungen zeigen, ob die Expression von Ad12-E1B-19 kDa in dieser Zelllinie gegenüber den nicht-onkogenen Ad12-E1Am-Zelllinien reduziert ist.

5.5 Die Regression von Tumoren in immunkompetenten syngen BALB/c-Mäusen ist wahrscheinlich die Folge einer NK-Zell-Antwort des Wirtstiers und/oder einer Minderversorgung des Tumorgewebes

Entgegen unseren Erwartungen bildeten sich mit Ausnahme zweier Tumoren der Zelllinie Ad12-E1Am2 alle in immunkompetenten syngen Tieren induzierten Tumoren zurück. In Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl verschwanden die Tumoren 10 bis 22 Tagen p. i. Der Grund für die Regression von Tumoren der Zelllinien Ad12-E1Awt1/2 und Ad12-E1Am2 ist zur Zeit nicht klar. Doch scheint Tumorregression ein generelles Phänomen bei Ad12-Tumormodellen zu sein, das auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (siehe z. B. Jelinek *et al.*, 1994; Telling und Williams, 1994). Im Fall der Ad12-E1Awt/m-Tumoren könnte die Regression die Folge einer unspezifischen NK-Zell-Antwort auf die Expression des *neo*-Gens sein, das als Selektionsmarker für die rekombinanten Retroviren dient. Daten von Liberatore *et al.* (1999) belegen, dass T-Lymphozyten durch die Infektion mit dem LXS-N-Retrovirusvektor für die Lyse durch NK-Zellen sensibilisiert werden. Verantwortlich für die Eliminierung der LXS-N-infizierten Zellen ist die Expression des *neo*-Resistenzgens durch das rekombinante Virus. Die Hypothese, dass das Neo-Protein für die Tumorregression in immunkompetenten Tieren verantwortlich ist, wird durch die Beobachtung gestützt, dass in der einzigen Zelllinie, deren Tumoren sich in 2 von 4 Fällen nicht zurückbildeten (Ad12-E1Am2), durch RT-PCR-Studien eine deutlich niedrigere Konzentration der Neo-mRNA nachweisbar war als in den Ad12-E1Awt-Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Zudem sind die Ad12-E1Am2-Zellen wesentlich empfindlicher gegenüber der Behandlung mit dem entsprechenden Antibiotikum G418 als die übrigen Zelllinien, die das gleiche Vektorkonstrukt integriert haben (Daten nicht gezeigt). Das Neo-Protein liegt demnach in dieser Zelllinie in wesentlich geringerer Konzentration vor als in den anderen getesteten Zelllinien. Für den Fall, dass die Tumorregression durch eine NK-Zell-Antwort gegen das Neo-Protein ausgelöst wird, könnten die Tumoren der Zelllinie Ad12-E1Am2 aufgrund der niedrigeren Neo-Expression der NK-Zell-Immunantwort des Wirtstiers entgehen. Durch TUNEL-Analysen wurden zudem apoptotische Zellen in regressiven Ad12-E1Awt-Tumoren nachgewiesen. Das Vorhandensein apoptotischer Zellen ist wiederum ein eindeutiger Hinweis

auf eine NK-Zell-vermittelte Tumorregression, möglicherweise hervorgerufen durch eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber einer NK-Zell Immunantwort, ausgelöst durch das Neo-Protein (als Übersicht siehe Warren und Smyth, 1999; Screpanti *et al.*, 2001). Ob eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Eliminierung durch NK-Zellen bei den Ad12-E1Awt-Zelllinien verglichen mit der Zelllinie Ad12-E1Am2 vorliegt, soll in Zukunft durch *in vitro* NK-Zell-Assays untersucht werden.

Eine andere Erklärung für die Tumorregression ist die unzureichende Versorgung des Tumorgewebes durch das Blutgefäßsystem des Wirtsorganismus. In HE-gefärbten Schnitten aller untersuchten Tumoren waren nekrotische Bereiche besonders im Innern der Tumoren erkennbar. Nekrose ist auch bei schnell wachsenden humanen Tumoren häufig zu beobachten und zumeist die Folge einer Minderversorgung des Tumorgewebes, bedingt durch eine unzureichende Neovaskularisation und/oder das Abdrücken bereits vorhandener Blutgefäße. Als Folge der unzureichenden Durchblutung kann es zu einer spontanen Regression solcher Tumoren kommen (pers. Mitteilung Prof. Dr. K. W. Schmid, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Essen). Für eine Minderversorgung als Grund für die Rückbildung der Ad12-E1Awt/m-induzierten Tumoren spricht die Zweiteilung der Tumoren in eine vitale Außenschicht und einen nekrotischen Kern. Im Fall einer reinen Immunreaktion des Wirtstiers wäre ein diffuser Zerfall des Tumors zu erwarten. Dabei kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass für die Rückbildung der Tumoren gleichzeitig auch andere Faktoren, wie z. B. die Rekrutierung des Immunsystems durch spezifische Tumormarker oder nekrotische Veränderungen, mit von Bedeutung sind (pers. Mitteilung Prof. Dr. K. W. Schmid). Auch die Schnelligkeit des Wachstums der Ad12-E1Awt-induzierten Tumoren weist auf einen kausalen Zusammenhang zwischen einer unzureichenden Neovaskularisation und der Tumorregression hin. Demnach wäre die Manifestierung zweier Tumoren der Zelllinie Ad12-E1Am2 lediglich eine Folge des langsameren Tumorwachstums und der daraus resultierenden besseren Versorgung des Tumorgewebes.

5.6 Eine hohe Expression von Ad12-E1A korreliert mit einer erhöhten Stabilität des zellulären Kofaktors p300

Um primäre Zellen zu transformieren und ein Tumorstwachstum zu induzieren, interagiert Ad12-E1A mit zellulären Faktoren, die bei der Zellzyklusregulation und der Tumorsuppression Schlüsselfunktionen ausüben. Ein entscheidender zellulärer Faktor bei der E1A-vermittelten Transformation ist der zelluläre Kofaktor p300. Zahlreiche Studien belegen, dass die *in vivo* Interaktion von E1A mit p300 für den Transformationsprozess von entscheidender Bedeutung ist. (als Übersicht siehe Goodman und Smolik, 2000 und Referenzen darin). Bezugnehmend auf adenovirale Systeme wurde zudem gezeigt, dass eine ektopische Überexpression von p300 der Transformation primärer Zellen durch Ad5-E1-Genprodukte entgegenwirkt (Smits *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde die funktionelle Wechselwirkung von Ad12-E1A und p300 in den Ad12-E1Awt- und Ad12-E1Am-transformierten Zelllinien untersucht. Entgegen vorheriger Annahmen wurde in allen Zelllinien mit einer hohen Ad12-E1A-Expression eine hohe p300-Konzentration detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter der Voraussetzung der Funktionalität des Kofaktors im Gegensatz zu Ad5-E1A eine hohe Konzentration von p300 einer Transformation der Zelle durch Ad12-E1A nicht per se entgegenwirkt. Sollte p300 in diesen Zelllinien als intaktes Protein vorliegen, kann man daraus schließen, dass Ad12-E1A im Zuge der zellulären Transformation auf andere Weise funktionell mit p300 interagiert als Ad5-E1A. Diese Annahme wird von Daten der eigenen Arbeitsgruppe gestützt, die zeigen, dass die E1A-Proteine der beiden Serotypen auf unterschiedliche Weise physikalisch mit p300 interagieren (Lipinski *et al.*, 1999). Eine Publikation von Pereira und Mitarbeitern (1994) liefert zudem Hinweise darauf, dass in Ad12-transformierten Zellen p300 in einem anderen Phosphorylierungszustand vorliegt als in Zellen, die durch Ad5 transformiert sind. Das Vorliegen unterschiedlicher Phosphorylierungszustände von p300 in den transformierten Zellen ist ein Hinweis darauf, dass die E1A-Proteine von Ad5 und Ad12 p300 auf verschiedene Weise durch posttranskriptionelle Modifikation beeinflussen. Folglich kann p300 in Ad5-transformierten Zellen in einem funktionell anderen Zustand vorliegen als in Ad12-transformierten.

Die Ergebnisse meiner Untersuchung zeigen, dass die Ursache für die hohe p300-Konzentration in den Ad12-E1A hoch exprimierenden Zelllinien eine Folge der Stabilisierung von p300 ist. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit die Stabilisierung eine Folge des

Transformationsprozesses ist oder aus der Interaktion mit Ad12-E1A oder möglicherweise auch mit Ad12-E1B resultiert. Da in den nachweislich transformierten Zelllinien Ad12-E1Awt1 und Ad12-E1Awt2, die Ad12-E1A schwach exprimieren, sehr niedrige p300-Konzentrationen detektiert wurden, ist nicht davon auszugehen, dass p300 allgemein als Folge des Transformationsprozesses stabilisiert wird. Auch konnte bis heute keine direkte Interaktion zwischen p300 und Ad12-E1B nachgewiesen werden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass Ad12-E1B eine Stabilisierung von p300, z. B. durch posttranskriptionelle Modifikation oder physikalische Interaktion, induziert. Über eine mögliche Interaktion von Ad12-E1B mit zellulären Strukturen, die an der Degradation von Proteinen beteiligt sind, liegen ebenfalls bis heute keine Daten vor. Daraus kann geschlossen werden, dass die hohe Konzentration von Ad12-E1A für die Stabilisierung von p300 verantwortlich ist.

Hinweise auf einen möglichen Angriffspunkt für die Ad12-E1A-Proteine bei der Stabilisierung von p300 geben Studien von Iwao *et al.* (1999), die zeigen, dass zumindest ein gewisser Anteil der p300-Moleküle in der Zelle in ubiquitiniert Form vorliegt. Untersuchungen von Poizat und Mitarbeitern (2000) belegen darüber hinaus, dass p300 in Kardiozyten durch den 26S-Proteasomenkomplex, eine zelluläre Struktur, die für den Abbau von Proteinen in der Zelle verantwortlich ist, abgebaut wird. Besonders kurzlebige Proteine, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, werden häufig gezielt durch Ubiquitinierung markiert und infolgedessen zu den Proteasomen transportiert und dort degradiert (als Übersicht siehe Coux *et al.*, 1996; Hilt und Wolf, 1996). Die o. g. Untersuchungen lassen die Annahme zu, dass eine Stabilisierung von p300 über die Inhibierung der Degradation durch die Proteasomen der Zelle erfolgen könnte. Da die Konzentration von p300 in der niedrig Ad12-E1A-exprimierenden Zelllinie Ad12-E1Awt2 durch die Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG-132 um ein Vielfaches gesteigert wird, ist anzunehmen, dass die Degradation von p300 auch in den Ad12-E1A/E1B-transformierten Zelllinien über den proteasomalen Abbauweg erfolgt. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Ad-E1A die regulatorische 19S Untereinheit der Proteasomen Sug1 (S8) und S4 bindet. Als Folge dessen wird die ATPase-Aktivität von S4 inhibiert und die durch das HPV16-E6-Protein induzierte proteasomale Degradation von p53 verhindert (Grand *et al.*, 1999; Turnell *et al.*, 2000). Es wäre demnach möglich, dass Ad12-E1A die proteasomale Maschinerie, infolge einer direkten Interaktion mit S4 und S8, blockiert und p300 dadurch stabilisiert. Ein alternativer Mechanismus wäre, dass Ad12-E1A durch seine physikalische Interaktion mit p300 den Zugang des Koaktivators zu dem Proteasomenkomplex verhindert. Die Inhibierung der Ubiquitinierung von p300 durch Ad-

E1A ist hingegen aufgrund der Tatsache, dass zumindest ein Anteil der p300-Moleküle in der Zelle in ubiquitiniert Form an E1A gebunden vorliegt (Avantaggiati *et al.*, 1996), als Grund für die Stabilisierung von p300 unwahrscheinlich.

Die Hypothese einer direkten p300-Stabilisierung durch Ad12-E1A wird weiterhin durch folgenden Befund gestützt. In C33A-Zellen konnte nach Infektion mit Ad12-Wildtypviren ein Anstieg der p300-Konzentration etwa zeitgleich mit dem Einsetzen der Ad12-E1A-Expression detektiert werden. Die Tatsache, dass eine hohe Expression von Ad12-E1A einen Anstieg der Konzentration des Koaktivators p300 bewirkt, steht jedoch im Kontrast zu den scheinbar hauptsächlich gegensätzlichen Funktionen von p300 und Ad12-E1A bei der Regulation der zellulären Proliferation und der Transformation. So inhibiert p300 als Koaktivator von p53 die Zell-Proliferation (Gu *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997) und ist ein wichtiger Faktor bei der Differenzierung einiger Zelltypen, wie z. B. Muskelzellen, B-Zellen oder Melanozyten (Eckner *et al.*, 1996; Hasegawa *et al.*, 1997; Kitabayashi *et al.*, 1998). E1A hingegen induziert in teilungsinaktiven Zellen die Zellzyklusprogression und wirkt als virales Onkogen positiv auf die Proliferation (als Übersicht siehe Nevins und Vogt, 1996). Da die Bindung von E1A an p300 für die Transformation primärer Zellen durch E1A essentiell ist, spekulieren einige Autoren, dass für das Durchlaufen des Zellzyklus spezifische p300-Funktionen inhibiert werden müssen (siehe z. B. Howe und Bayley, 1992; Kolli *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigen Daten von Ait-Si-Ali und Mitarbeitern (2000), dass die HAT-Aktivität von p300 für den E2F-vermittelten Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase essentiell ist. Die Aktivierung der HAT-Aktivität von p300 erfolgt durch spezifische Phosphorylierung im Bereich des C-Terminus oder durch physikalische Interaktion mit E1A in transformierten Zellen (Ait Si Ali *et al.*, 1998). Allein diese Daten machen eine generelle Zellzyklus-reprimierende Funktion von p300 unwahrscheinlich. Sie lassen vielmehr die Schlussfolgerung zu, dass bestimmte p300-Funktionen für die Induktion des Zellzyklus durch E1A notwendig sind. Es kann daher postuliert werden, dass innerhalb eines abgegrenzten Zeitraums im Verlauf des viralen Infektionszyklus bestimmte Funktionen von p300 für die S-Phase-Induktion benötigt werden. Die Erhöhung der p300-Konzentration 8 h nach Infektion von C33A-Zellen mit Ad12-Viren als Folge einer Stabilisierung durch Ad12-E1A wäre demnach ein wichtiger Schritt für die Induktion der S-Phase in Zellzyklus-arretierten Zellen durch Ad12-E1A und somit eine Voraussetzung für das Durchlaufen des produktiven Zyklus oder die Transformation bei der Infektion nicht-permissiver Zellen. Eine andere Erklärung für die hohe p300-Konzentration in hoch Ad12-E1A-exprimierenden Zellen ist die Annahme, dass die p300- und die Ad12-E1A-Moleküle in der Zelle in einem bestimmten molaren

Verhältnis vorliegen müssen, damit eine erfolgreiche Infektion oder Transformation stattfinden kann. Die Stabilisierung von p300 wäre somit als ein Mechanismus zur Angleichung seiner Konzentration an die von E1A zu betrachten und gleichzeitig die Grundvoraussetzung für eine optimale Einflussnahme von Ad12-E1A auf distinkte p300-Funktionen.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit C33A-Zellen konnte in Ad12-infizierten HeLa-Zellen trotz nachweisbar hoher Ad12-E1A/E1B-Expression keine Erhöhung der p300-Konzentration beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der p300-Konzentration in Korrelation mit der Expression von Ad12-E1A ist demnach abhängig vom zellulären Kontext. Bei C33A-Zellen handelt es sich um spontan transformierte Zellen epithelialer Herkunft, in denen bis heute keine viralen Sequenzen nachgewiesen werden konnten (Crook *et al.*, 1991). Im Fall der HeLa-Zellen wurde hingegen die Integration von DNA-Sequenzen des hoch-onkogenen humanen Papillomavirus Typ 18 (HPV18) sowie die Transkription der mRNAs der transformierenden frühen HPV-Proteine E6/E7 beschrieben (Schwarz *et al.*, 1985). Interessanterweise bindet das E6-Protein des hoch-onkogenen HPV16 an drei unterschiedliche Domänen von p300 und inhibiert dadurch dessen aktivierendes Potential (Patel *et al.*, 1999). Aufgrund der ähnlichen Funktion der E6-Proteine beider Papillomavirus-Subtypen bei der onkogenen Transformation ist davon auszugehen, dass das E6-Protein von HPV18 ebenfalls mit p300 interagiert. Die physikalische Interaktion von E6 mit p300 könnte demnach der Ad12-E1A-vermittelten Stabilisierung von p300 z. B. durch Verdrängung von Ad12-E1A aus dem Koaktivator-Komplex entgegenwirken.

Die hier präsentierten Ergebnisse geben neue Einblicke in die Funktion distinkter Ad12-E1A-Spleißprodukte im Prozess der onkogenen Transformation durch Ad12-E1A-Genprodukte. Die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} wurden dabei als wichtige Faktoren bei der Repression der MHC-Klasse-I-Expression und der Tumorinduktion durch Ad12-E1A/E1B und somit als putative onkogene Determinanten von Ad12 identifiziert. Des weiteren wurden neue Erkenntnisse zur funktionellen Interaktion von Ad12-E1A mit dem zellulären Kofaktor p300 bei der Transformation durch Ad12-E1 gewonnen. Mit der Stabilisierung des zellulären Kofaktors p300 in transformierten und infizierten Zellen steht Ad12-E1A möglicherweise zudem ein bisher unbekannter Mechanismus zur Modulation von p300-Funktionen in infizierten und/oder transformierten Zellen zur Verfügung.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die E1A-Proteine sind verantwortlich für die unterschiedliche Onkogenität der verschiedenen Ad-Serotypen in nicht-permissiven Wirtssystemen. Sie vermitteln ihre Funktionen über Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren, die u. a. an der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung oder der Apoptose beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer onkogener Determinanten in der E1A-Region des hoch onkogenen Ad12. Die Untersuchungen wurden an BALB/c-Zelllinien vorgenommen, die entweder durch die Ad12-E1Awt-Region oder eine Ad12-E1A-Mutante, die aufgrund einer Punktmutation die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und Ad12-E1A_{9,5S} nicht mehr synthetisieren kann, in Kombination mit Ad12-E1B transformiert sind. Durch die Charakterisierung der generierten Zelllinien habe ich zwei Ad12-E1Awt-Zelllinien, drei Ad12-E1Am-Zelllinien, eine Ad12-13Swt-Zelllinie sowie drei Ad12-13Sm-Zelllinien selektiert, die für weitere *in vitro* und *in vivo* Studien verwendet wurden. Meine Studien belegen, dass für die Transformation primärer Zellen durch Ad12-Genprodukte die Expression einer Ad12-13S-cDNA oder der Ad12-E1Am-Region zusammen mit Ad12-E1B ausreicht. Für eine effektive Tumorinduktion in immunkompetenten syngenesischen Mäusen müssen jedoch neben Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} auch die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und/oder Ad12-E1A_{9,5S} exprimiert werden. Mit Hilfe von FACS-Analysen konnte ich außerdem erstmalig zeigen, dass für eine effektive Suppression der MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche Ad12-transformierter Zellen das Protein Ad12-E1A_{13S} alleine nicht ausreicht. Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Tumorinduktionsstudien wird zudem deutlich, dass eine Korrelation zwischen der vollständigen Repression der MHC-Klasse-I-H2-k^d-Expression und einer Tumorigenität in immunkompetenten syngenesischen Mäusen besteht. Die Expression der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} und/oder Ad12-E1A_{9,5S} ist somit von großer Bedeutung für die onkogene Transformation durch Ad12-E1-Genprodukte.

Einen weiteren Schwerpunkt meiner Arbeit bildete die Untersuchung der Rolle des zellulären Kofaktors p300 bei der Transformation durch Ad12-E1-Genprodukte. Dabei konnte ich nachweisen, dass eine Korrelation zwischen einer hohen Ad12-E1A/E1B-Expression und einer erhöhten p300-Konzentration in den Ad12-E1-transformierten Zelllinien besteht. Die erhöhte Konzentration von p300 in diesen Zellen ist die Folge einer Stabilisierung des Kofaktors auf Proteinebene. Untersuchungen der p300-Konzentration im Verlauf der

Infektion permissiver Zellen mit Ad12-Viren zeigten, dass das Einsetzen der Ad12-E1A-Expression mit einer Erhöhung der Konzentration von p300 korreliert. Diese Ergebnisse belegen, dass eine hohe p300-Konzentration der Transformation primärer BMK-Zellen durch Ad12-E1A/E1B nicht per se entgegenwirkt.

Aufbauend auf den Ergebnissen meiner Untersuchungen soll nun durch Kotransfektionsexperimente mit primären BMK-Zellen untersucht werden, ob eines der Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} oder Ad12-E1A_{9,5S} die verminderte Fähigkeit zur Repression der MHC-Klasse-I-Expression durch die Genprodukte der Ad12-E1Am-Region komplementieren kann. Ferner sollen NK-Zell-Assays zur Aufklärung der Abläufe beitragen, die zu der Regression der Ad12-E1Awt-Tumoren in immunkompetenten syngenischen Mäusen führen. Ein weiteres Ziel ist die detaillierte Aufklärung der Mechanismen, die zur Stabilisierung von p300 führen. Studien mit Ad12-E1A-Antisense-DNA/RNA könnten hierbei Aufschluss darüber geben, ob die hohe Ad12-E1A-Expression in den Ad12-E1A/E1B-transformierten BMK-Zelllinien für die Stabilisierung von p300 verantwortlich ist. In einem anderen Ansatz könnte der Mechanismus der Stabilisierung von p300 durch Überexpression einer E1A-Mutante, die nicht mehr an p300 oder die proteasomalen Untereinheiten S4 und S8 bindet, analysiert werden. Solche Untersuchungen könnten dazu beitragen, über die hier dargelegten Ergebnisse hinaus weitere Einsichten in die Mechanismen der onkogenen Transformation primärer Zellen und die Regulation des E1A-assoziierten Faktors p300 durch Ad12-E1A zu gewinnen.

7 Literaturverzeichnis

Ackrill, A. M. und Blair, G. E. (1989): Nuclear proteins binding to an enhancer element of the major histocompatibility class I promoter: differences between highly oncogenic and non-oncogenic adenovirus-transformed rat cells. *Virology* **172**: 643-646.

Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., Trouche, D. und Harel-Bellan, A. (1998): Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396**: 184-186.

Ait-Si-Ali, S., Polesskaya, A., Filleur, S., Ferreira, R., Duquet, A., Robin, P., Vervish, A., Trouche, D., Cabon, F. und Harel-Bellan, A. (2000): CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* **19**: 2430-2437.

Angel, P. und Karin, M. (1991): The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., et al., eds. (1997): Current protocols in molecular biology. New York: Wiley

Avantaggiati, M. L., Carbone, M., Graessmann, A., Nakatani, Y., Howard, B. und Levine, A. S. (1996): The SV40 large T antigen and adenovirus E1A oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300. *EMBO J.* **15**: 2236-2248.

Avantaggiati, M. L., Okryzko, V. V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. und Kelly, K. (1997): Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**: 1175-1184.

Bailey, A. und Mautner, V. (1994): Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology* **205**: 438-452.

Bayley, S. T. und Mymryk, J. S. (1994): Adenovirus E1A proteins and transformation. *Int. J. Oncol.* **5**: 425-444.

Berk, A. J. (1986): Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 45-79.

Berk, A. J., Boyer, T. G., Kapanidis, A. N., Ebright, R. H., Kobayashi, N. N., Horn, P. J., Sullivan, S. M., Koop, R., Surby, M. A. und Triezenberg, S. J. (1998): Mechanisms of viral activators. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 243-252.

Bernards, R., Schrier, P. I., Houweling, A., Bos, J. L., van der Eb, A. J., Zylstra, M. und Melief, C. J. M. (1983): Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* **305**: 776-797.

Billon, N., van Grunsven, L. A. und Rudkin, B. B. (1996): The CDK inhibitor p21WAF1/Cip1 is induced through a p300-dependent mechanism during NGF-mediated neuronal differentiation of PC12 cells. *Oncogene* **13**: 2047-2054.

Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees E., Ricciardi, R. P. und Berk, A. J. (1999): Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* **399**: 276-279.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brockmann, D., Tries, B. und Esche, H. (1990): Isolation and characterisation of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA cloning. *Virology* **179**: 585-590.

Brockmann, D. und Esche, H. (1995): Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**: 81-112.

Brockmann, D., Schäfer, D., Kirch, H. C. und Esche, H. (1996): Repression of c-Jun-induced mouse major histocompatibility class I promoter (H-2K^b) activity by the adenovirus type 12-unique 52R E1A protein. *Oncogene* **12**: 1715-1725.

Brockmann, D., Pützer, B. M., Lipinski, K. S., Schmücker U. und Esche, H. (1999): A multiprotein complex consisting of the cellular coactivator p300, AP-1/ATF, as well as NFκB is responsible for the activation of the mouse major histocompatibility class I (H-2K^b) Enhancer A. *Gene Expression* **8**: 1-18.

Brockmann, D., Fax. P., Hashemi, R., Kullmann, S., Lehmkuhler, O., Nolte, C. und Esche, H. (2001): Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* **3**: 277-295.

Broker, T. R., Keller, C. C. und Roberts, R. J. (1984): Human adenovirus serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. In: *Genetic maps*, Vol. 3 (O' Brian, S. J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 99-110.

Burgert. H. G., Maryanaska, J. L. und Kvist, S. (1987): „E3/19K“ protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytotoxic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1356-1360.

Byrd, P. J., Grand, R. J. und Gallimore, P. H. (1988): Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1 regions and combinations of E1A + ras. *Oncogene* **2**: 477-484.

Cepco, C. L., Roberts, B. E. und Mulligan, R. C. (1984): Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* **37**: 1053-1062.

Cohen, C. J., Shieh, J. T. C., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. und Bergelson J. M. (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 15191-15196.

Cook, J. L., May, D. L., Lewis, A. M. Jr. und Walker, T. A. (1987): Adenovirus E1A gene induction of susceptibility to lysis by natural killer cells and activated macrophages in infected rodent cells. *J. Virol.* **61**: 3510-3520.

Coux, O., Tanaka, K. und Goldberg, A. L. (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 801-847.

Crook, T., Wrede, D. und Vousden, K. H. (1991): p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* **6**: 873-875.

Cullan, B. R. (2001): Journey to the center of the cell. *Cell* **105**: 697-700.

Debbas, M. und White, E. (1993): Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* **7**: 546-554.

Doerfler, W. (1969): Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* **38**: 587-606.

Eager, K. B., Williams, J., Breiding, D., Pan, S., Knowles, E., Appella, E. und Ricciardi, R. P. (1985): Expression of histocompatibility antigens H-2K, -D, and -L is reduced in adenovirus-12-transformed mouse cells and is restored by interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5525-5529.

Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B. und Livingston, D. M. (1994): Molecular cloning and functional analysis of the Adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* **8**: 869-884.

Eckner, R., Yao, T. P., Oldread, E. und Livingston, D. M. (1996): Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* **10**: 2478-2490.

Esche, H., Schilling, R. und Doerfler, W. (1979): In vitro translation of adenovirus type 12-specific mRNA isolated from infected and transformed cells. *J. Virol.* **30**: 21-31.

Esche, H. und Siegmann, B. (1982): Expression of early viral gene products in adenovirus type 12 infected and transformed cells. *J. Virol.* **60**: 99-113.

Fax, P., Lipinski, K. S., Esche, H. und Brockmann, D. (2000): cAMP-independent activation of the Adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A_{12S}, and CBP to the E2-CRE. *J. Biol. Chem.* **275**: 8911-8920.

Ferguson, B., Kripple, B., Andrisani, O., Jones, N., Westphal, H. und Rosenberg, M. (1985): E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherichia coli* both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2653-2661.

Flint, J. und Broker, T. R. (1981): Lytic infection by adenoviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses* (Tooze, J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 443-547.

Flint, J. und Shenk, T. (1997): Viral transactivating proteins. *Ann. Rev. Genet.* **31**: 177-212.

Föhring, B., Gallimore, P. H., Mellow, G. H. und Raska, K. jr. (1983): Adenovirus type 12 specific cell surface antigen in transformed cells is a product of the E1A early region. *Virology* **131**: 463-472.

Freedman, V. H. und Shin, S. I. (1974): Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* **3**: 355-359.

Friedmann, D. J. und Ricciardi, R. P. (1988): Adenovirus type 12 E1A gene represses accumulation of MHC Class I mRNA at the level of transcription. *Virology* **165**: 303-305.

Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W. S., Nakatani, Y. und Livingston, D. M. (2001): The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* **106**: 297-307.

Gabler, S., Schütt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. und Dobner, T. (1998): E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**: 7960-7971.

Gallimore, P. H. und Turnell, A. S. (2001): Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* **20**: 7824-7835.

Ge, R., Kralli, A., Weinmann, R. und Ricciardi, R. P. (1992): Down-regulation of the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells is accompanied by an increase in factor binding. *J. Virol.* **66**: 6969-6978.

Gey, G., Coffman, W. und Kubicek, M. T. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265.

Giles, R. H., Peters, D. J. M. und Breuning, M. H. (1998): Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet.* **14**: 178-183.

Gooding, L. R., Elmore, L. F., Tollefson, A. E., Brody, H. A. und Wold, W. S. M. (1988): A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**: 341-346.

Gooding, L. R., Aquino, L., Duerksen-Huges, P. J., Day, D., Horton, T. M., Yei, S. P. und Wold, W. S. (1991): The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytolysis of human cells but not of mouse cells. *J. Virol.* **65**: 3080-3094.

Goodman, R. H. und Smolik, S. (2000): CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* **14**: 1553-1577.

Grand, R. J. A., Grant, M. L. und Gallimore, P. H. (1994): Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* **203**: 229-240.

Grand, R. J. A., Owen, D., Rookes, S. M. und Gallimore, P. H. (1996): Control of p53 expression by adenovirus 12 early region 1A and early region 1B 54K proteins. *Virology* **218**: 23-34.

Grand, R. J. A., Turnell, A. S., Mason, G. G. F., Wang, W., Milner, A. E., Mymryk, J. S., Rookes, S. M., Rivett, A. J. und Gallimore P. H. (1999): Adenovirus early region 1A protein binds to mammalian SUG1-a regulatory component of the proteasome. *Oncogene* **18**: 449-458.

Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P. und Helenius, A. (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**: 477-486.

Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W. und Helenius, A. (1997): The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* **16**: 5998-6007.

Grossman, S. R., Perez, M., Kung, A. L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z. X., Kumar, S., Howley, P. M. und Livingston, D. M. (1998): P300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol. Cell* **2**: 405-415.

Gu, W., Shi, X. L. und Roeder, R. G. (1997): Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-823.

Haddada, H., Lewis, A. M., Sogn, J. A., Coligan, J. E., Cook, J. L., Walker, T. A. und Levine, A. S. (1986): Tumorigenicity of hamster and mouse cells transformed by adenovirus types 2 and 5 is not influenced by the level of class I major histocompatibility antigens expressed on the cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9684-9688.

Halbert, D. N., Cutt, J. R. und Shenk. T. (1985): Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.* **56**: 250-257.

Han, J., Sabbatini P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. und White, E. (1996): The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* **10**: 461-477.

Harlow, E. und Lane, D. (1988): In: *Antibodies, A Laboratory Manual*. CSH Laboratory Press, CSH, New York, USA.

Hasegawa, K., Meyers, M. B. und Kitsis, R. N. (1997): Transcriptional coactivator p300 stimulates cell type-specific gene expression in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 20049-20054.

Hauptenthal, C. (1997): Untersuchungen zur Onkogenität des Adenovirus Serotyp 12. Dissertation, IMB (Tumorforschung), Universität-Gesamthochschule Essen.

Hilt, W. und Wolf, D. H. (1996): Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 96-102.

Hösel, M., Webb, D., Schröder, J., Schmitz, B. und Doerfler, W. (2001): Overexpression of the adenovirus type 12 (Ad12) pTP or E1A gene facilitates Ad12 DNA replication in nonpermissive BHK21 Hamster cells. *J. Virol.* **75**: 10041-10053.

Hollingsworth R. E. jr., Hensey, C. E. und Lee, W.-H. (1993): Retinoblastoma protein and the cell cycle. *Curr. Opin. Gene Dev.* **3**: 55-62.

Horwitz, M. S., Scharff, M. D. und Maizel, J. V. (1969): Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion. *Virology* **39**: 682-684.

Horwitz, M. S. (1990): Adenovirus. In: *Virology* (Fields, B. N. und Knipe, D. M., eds.), Raven Press, New York, pp. 1723-1740.

Houweling, A., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J. (1980): Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4,5 % fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**: 537-550.

Howe, J. A. und Bayley, S. T. (1992): Effects of Ad5 E1A mutant viruses on the cell cycle in relation to the binding of cellular proteins including the retinoblastoma protein and cyclin A. *Virology* **186**: 15-24.

Hurwitz, D. R. und Chinnadurai, G. (1985): Evidence that a second tumor antigen coded by adenovirus early region E1A is required for efficient cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 163-167.

Huvent, I., Cousin, C., Kiss, A., Baroni de Moraes, M. T., Bernard, C. und D'Halluin, J. C. (1997): Downregulation of major histocompatibility complex class I expression and susceptibility to natural killer cells in cells transformed with the oncogenic adenovirus 12 are regulated by different E1A domains. *Cancer Detect. Prev.* **21**: 12-21.

Ikeda, M. A. und Nevins, J. R. (1993): Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7029-7035.

Iwao, K., Kawasaki, H., Taira, K. und Yokoyama, K. K. (1999): Ubiquitination of the transcriptional coactivator p300 during induced differentiation. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **42**: 207-208.

Jelinek, T., Pereira, D. S. und Graham, F. L. (1994): Tumorigenicity of adenovirus-transformed rodent cells is influenced by at least two regions of adenovirus early region 1A. *J. Virol.* **68**: 888-896.

Jochemsen, H., Daniels, G. S. G., Hertoghs, J. J. L., Schrier, P. I., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J. (1982): Identification of adenovirus-type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis. *Virology* **122**: 15-28.

Jones, N. (1995): *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**: 59-80.

Kimelmann, D., Miller, J., Porter, D. und Roberts, B. (1985): E1A regions of human adenoviruses and the highly oncogenic simian virus 7 are closely related. *J. Virol.* **53**: 399-409.

Kitabayashi, I., Yokoyama, A., Shimizu, K. und Ohki, M. (1998): Interaction and functional cooperation of the leukaemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.* **17**: 2994-3004.

Kolli, S., Buchmann, A. M., Williams, J., Weitzmann, S. und Thimmapaya, B. (2001): Antisense-mediated depletion of p300 in human cells leads to premature G1 exit and up-regulation of c-Myc. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4646-4651.

Korber, B., Mermod, N., Hood, L. und Stroynowski, I. (1988): Regulation of gene expression by interferons: control of H-2 promoter responses. *Science* **239**: 1302-1306.

Kralli, A., Ge, R., Graeven, U., Ricciardi, R. P. und Weimann, R. (1992): Negative regulation of the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells via a retinoic acid response element. *J. Virol.* **66**: 6979-6988.

Kushner, D. B. und Ricciardi, R. P. (1999). Reduced phosphorylation of p50 is responsible for diminished NF-kappaB binding to the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2169-2179.

Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophag T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lamberti, C. und Williams, J. (1990): Differential requirement for adenovirus type 12 E1A gene products in oncogenic transformation. *J. Virol.* **64**: 4997-5007.

Lane, D. P. (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16.

Law, L. K. und Davidson, B. L. (2002): Adenovirus serotype 30 fiber does not mediate transduction via the coxsackie-adenovirus receptor. *J. Virol.* **76**: 656-661.

Lehmkuhler, O. (1999): Charakterisierung Ad12 E1A/E1B-transformierter Mauszelllinien. Diplomarbeit, IMB (Tumorforschung), Universität-Gesamthochschule Essen.

Liberatore, C., Capanni, M., Albi, N., Volpi, I., Urbani, E., Ruggeri, L., Mencarelli, A., Grignani, F. und Velardi, A. (1999): Natural killer cell-mediated lysis of autologous cells modified by gene therapy. *J. Exp. Med.* **189**: 1855-1862.

Lill, N., Grossmann, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. und Livingston, D. M. (1997): Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**: 823-827.

Lindl, T. und Bauer, J. (1994): Klonierung in Weichagar. In: Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 198.

Lipinski, K. S., Fax, P., Wilker, B., Hennemann, H., Brockmann, D. und Esche, H. (1999): Differences in the interactions of oncogenic adenovirus 12 early region 1A and nononcogenic adenovirus 2 early region 1A with the cellular coactivators p300 and CBP. *Virology* **255**: 94-105.

- Liu, F. und Green, M. R. (1990):** A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1A Protein. *Cell* **61**: 1217-1224.
- Liu, X., Ge, R., Westmoreland, S., Cooney, A. J., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J. und Ricciardi, R. P. (1994):** Negative regulation by the R2 element of the MHC class I enhancer in adenovirus-12 transformed cells correlates with high levels of COUP-TF binding. *Oncogene* **9**: 2183-2190.
- Liu, X., Ge, R. und Ricciardi, R. P. (1996):** Evidence for the involvement of a nuclear NF-kappa B inhibitor in global down-regulation of the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 398-404.
- Macpherson, I. und Montagnier, L. (1964):** Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* **23**: 291-294.
- Meijer, I., Boot, A. J. M., Mahabier, G., Zantema, A. und van der Eb, A. J. (1992):** Reduced binding activity of transcription factor NF-kB accounts for MHC Class I repression in adenovirus type 12 E1-transformed cells. *Cell. Immunol.* **145**: 56-65.
- Montell, C., Courtois, G., Eng, C. und Berk. A. (1984):** Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins. *Cell* **36**: 951-961.
- Moore, M., Horikoshi, N. und Shenk. T. (1996):** Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 11295-11301.
- Moran, E., Zerler, B., Harrison, T. M. und Mathews, M. B. (1986):** Identification of separate domains in the E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3470-3480.
- Moran, E. (1994):** Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Semin. Virol.* **5**: 327-340.
- Morgenstern, J. P. und Land, H. (1990):** Advanced mammalian gene transfer: high titer retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper free packing cell line. *Nucl. Acids Res.* **18**: 3587-3596.
- Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Mymryk, J. S. und Smith, M. M. (1997):** Influence of the adenovirus 5 E1A oncogene on chromatin remodelling. *Biochem. Cell. Biol.* **75**: 95-102.

Nabholz, M. und MacDonald, H. R. (1983). Cytolytic T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **1**: 273-306.

Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (2001): „Hit and run“ transformation by adenovirus oncogenes. *J. Virol.* **75**: 3089-3094.

Nevins, J. R. und Vogt, P. K. (1996): Cell transformation by viruses. In: *Fundamental Virology* (Fields, B. N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 267-309.

Norrby, E., Bartha, A. und Boulanger, P. (1976): Adenoviridae. *Intervirology* **7**: 117-125.

Opalka, B., Reith-Witkowski, M., Roy, A., Gnauck, J. und Schulte-Holthausen, H. (1992): The transformation defective adenovirus 12 host range mutant CS-1 lacks the E1A specific mRNA and contains a second deletion in E1B. *Intervirology* **33**: 211-216.

Pastan, I., Seth, P., Fitzgerald, D. und Willingham, M. (1987): Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. In: *Concepts in viral pathogenesis* (Notkins, A. und Oldstone M. B. A., eds.), Springer Verlag, New York, pp. 141-146.

Patel, D., Huang, S. M., Baglia, L. A. und McCance, D. J. (1999): The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* **18**: 5061-5072.

Pereira, D. S., Jelinek, T. und Graham, F. L. (1994): The adenovirus E1A-associated p300 protein is differentially phosphorylated in Ad12 E1A- compared to Ad5 E1A-transformed rat cells. *Int. J. Oncol.* **5**: 1197-1205.

Perricaudet, M., Le Moullec, J., Toillais, P. und Petterson, U. (1980): Structure of two adenovirus type 12 transforming polypeptides and their evolutionary implications. *Nature* **288**: 174-176.

Pestell, R. G., Albanese, C., Lee, R. J., Watanabe, G., Moran, E., Johnson, J. und Jameson, J. L. (1996): A potential role for cell cycle control proteins in regulation of the cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive glycoprotein hormone alpha subunit gene. *Cell. Growth Differ.* **7**: 1337-1344.

Philipson, L. (1983): Structure and assembly of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 1-53.

Pilder, S., Moore, M., Logan, J. und Shenk, T. (1986): The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilisation of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 470-476.

Poizat, C., Sartorelli, V., Chung, G., Kloner, R. A. und Kedes, L. (2000): Proteasome-mediated degradation of the coactivator p300 impairs cardiac transcription. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 8643-8654.

Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G. M., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I. und Wickham, T. J. (1998): The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* **72**: 7909-7915.

Rotem-Yehudar, R., Groettrup, M., Soza, A., Kloetzel, P. M. und Ehrlich, R. (1996): LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC-molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J. Exp. Med.* **183**: 499-514.

Rowe, W. P., Heubner, R. J., Gallimore, L. K., Parrot, R. H. und Ward, T. G. (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **84**: 570-573.

Ruley, H.E. (1983): Adenovirus early region 1 A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**: 602-606.

Sabbatini, P., Chiou, S. K., Rao, L. und White E. (1995): Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1060-1070.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual, second edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez, Y., el-Naggar, A., Pathak, S. und Killary, A. M. (1994): A tumor suppressor locus within 3p14-p12 mediates rapid cell death of renal cell carcinoma *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3383-3387.

Sarnow, P., Ho, Y., Williams, J. und Levine, A. J. (1982): Adenovirus E1B-58K tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54K cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**: 387-394.

Sawada, Y. und Fujinaga, K. (1980): Mapping of adenovirus type 12 mRNAs transcribed from the transforming region. *J. Virol.* **36**: 639-651.

Schneider, J. F., Fisher, F., Goding, C. R. und Jones, N. C. (1987): Mutational analysis of the adenovirus E1A gene: the role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J.* **6**: 2053-2060.

Schouten, G. J., van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1995): Downregulation of MHC Class I expression due to interference with p105-NF-kappa B1 processing by Ad12E1A. *EMBO J.* **14:** 1498-1507.

Schrier, P. I., Bernards, R., Vaessen, R. T. M. J., Houweling, A. und van der Eb, A. J. (1983). Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* **305:** 771-775.

Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. und zur Hausen, H. (1985): Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314:** 111-114.

Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Ljunggren, H.-G. und Grandien, A. (2001): A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumours by NK cells. *J. Immunol.* **167:** 2068-2073.

Shenk, T. (1996): Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, Third Edition, (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.

Shikama, N., Lyon, J. und La Thangue, B. (1997): The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol.* **7:** 230-236.

Shirayoshi, Y., Miyazaki, J., Burke, P. A., Hamada, K., Apella, E. und Ozato, K. (1987): Binding of multiple nuclear factors to the 5' upstream regulatory element of the murine major histocompatibility complex class I gene. *Mol. Cell. Biol.* **12:** 4542-4548.

Sidle, A., Palaty, C., Dirks, P., Wiggan, O., Kiess, M., Gill, R. M., Wong, A. K. und Hamel, P. A. (1996): Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130 during cellular proliferation and differentiation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **31:** 237-271.

Slansky, J. E. und Farnham, P. J. (1996): Introduction to the E2F family: Protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208:** 13-30.

Smirnov, D. A., Hou, S., Liu, X., Claudio, E., Siebenlist, U. K. und Ricciardi, R. P. (2001): COUP-TFII is up-regulated in adenovirus type 12 tumorigenic cells and is a repressor of MHC class I transcription. *Virology* **284:** 13-19.

Smits, P. H. M., de Wit, L., van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1996): The adenovirus E1A-associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation. *Oncogene* **12:** 1529-1535.

Soddu, S. und Lewis Jr, A. D. (1992): Driving adenovirus type 12-transformed BALB/c mouse cells to express high levels of class I major histocompatibility complex proteins enhances, rather than abrogates, their tumorigenicity. *J. Virol.* **66**: 2875-2884.

Southern, E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Sparer, T. E. und Gooding, L. R. (1998): Suppression of MHC class I antigen presentation by human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **232**: 135-147.

Stein, R. W., Corrigan, M., Yaciuk, P., Whelan, J. und Moran E (1990): Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the 300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity. *J. Virol.* **64**: 4421-4427.

Stephens, C. und Harlow, E. (1987): Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNA that encode 30 kd and 35 kd proteins. *EMBO J.* **6**: 2027-2035.

Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha, S. und Goff, S. P. (1996): Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1576-1583.

Sundararajan, R. und White, E. (2001): E1B 19K blocks bax oligomerisation and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *J. Virol.* **75**: 7506-7516.

Sussenbach, J. S. und van der Vliet, P. C. (1983): The mechanism of adenovirus DNA replication and the characterization of replication proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 53-75.

Telling, G. C. und Williams, J. (1994): Constructing chimeric type 12/type5 adenovirus E1A genes and using them to identify an oncogenic determinant of adenovirus type 12. *J. Virol.* **68**: 877-887.

Thomas, A. und White, E. (1998): Suppression of the p300-dependent mdm2 negative feedback loop induces the p53 apoptotic function. *Genes Dev.* **12**: 1975-1985.

Tollefson, A. E., Ryerse, J. S., Scaria, A., Hermiston, T. W. und Wold, W. S. M. (1996): The E3-11,6-kDa adenovirus death protein is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* **200**: 152-162.

Tooze, J. (1981): Molecular biology of tumor viruses - part 2, DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

Trotman, L. C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R. P. und Greber, U. F. (2001): Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell. Biol.* **3**: 1092-1100.

Turnell, A. S., Grand, R. J. A., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J. S. und Gallimore, P. H. (2000): Regulation of the proteasome by adenovirus E1A. *EMBO J.* **19**: 4759-4773.

Ulfendahl, P. J., Linder, S., Kreivi, J.-P., Nordquist, K., Svensson, C., Hultberg, H. und Akusjärvi, G. (1987): A novel adenovirus 2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties. *EMBO J.* **6**: 2037-2044.

Vaessen, R. T. M. J., Houweling, A., Israel, A., Kourilski, P. und van der Eb, A. J. (1986): Adenovirus E1A-mediated regulation of class I MHC expression. *EMBO J.* **5**: 335-341.

van den Elsen, P. J., Houweling, A. und van der Eb, A. J. (1983): Morphological transformation of human adenovirus is determined to a large extent by gene products of region E1A. *Virology* **131**: 242-246.

van der Eb, A. J., Mulder, C., Graham, F. L. und Houweling, A. (1977): Transformation with specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA. *Gene* **2**: 115-132.

van der Eb, A. J. und Bernards, R. (1984): Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 23-51.

Wadell, G. (1984): Molecular epidemiology of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 191-220.

Wang, H. G. H., Yaciuk, P., Ricciardi, R. P., Green, M., Yokoyama, K. und Moran, E. (1993): The E1A products of oncogenic adenovirus serotype 12 include an amino-terminally modified form able to bind the retinoblastoma protein but not p300. *J. Virol.* **67**: 4804-4813.

Warren, H. S. und Smyth, M. J. (1999): NK cells and apoptosis. *Immunol. Cell Biol.* **77**: 64-75.

Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. und Weitner, A. (1987): Molecular biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Melo Park, California, USA.

White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W. S. M., Kushner, D. I. und Gooding, L. (1992): The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2570-2580.

White, E. (1995): Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 33-59.

Whittaker, J. L., Byrd, P. J., Grand, R. J. A. und Gallimore, P. (1984): Isolation and characterisation of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol. Cell Biol.* **4**: 110-116.

Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. und Harlow, E. (1988A): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**: 124-129.

Whyte, P., Ruley, H. E. und Harlow, E. (1988B): Two regions of the adenovirus early region 1A are required for transformation. *J. Virol.* **62**: 257-265.

Wijsman, J. H., Jonker, R. R., Keijzer, R., van de Velde, C. J. H., Cornelisse, C. J. und van Dierendock, J. H. (1993): A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labeling of fragmented DNA. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 7-12.

Williams, J., Williams, M., Liu, C. und Telling, G. (1995): Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 149-177.

Yamit-Hezi, A., Plaskin, D. und Eisenbach, L. (1994): C-fos and c-jun overexpression in malignant cells reduces their tumorigenicity and metastatic potential, and effects their MHC class I gene expression. *Oncogene* **9**: 1065-1079.

Zerler, B., Moran B., Maruyama, K., Moomaw, J., Grodzicker, T. und Ruley, H. E. (1986): Adenovirus E1A coding sequences that enable *ras* and *pmt* oncogenes to transform cultured primary cells. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 887-899.

Zhang, H. S., Mak, S. und Branton, P. E. (1995): Adenovirus type 12 early region 1 B proteins and metabolism of viral mRNAs. *Virology* **191**: 793-802.

Zhang, H. S., und Dean, D. C. (2001): Rb-mediated structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* **20**: 3134-3138.

8 Publikationen

Fax, P., Lehmkuhler, O., Kühn, C., Esche, H. und Brockmann, D. (2000): E1A12S-mediated activation of the adenovirus type 12 E2 promoter depends on the histone acetyltransferase activity of p300/CBP. *J. Biol. Chem.* **275**: 40554-40560.

Brockmann, D., Fax, P., Hashemi, R., Kullmann, S., Lehmkuhler, O., Nolte, C. und Esche, H. (2001): Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* **3**: 277-295.

Brockmann, D., Lehmkuhler, O., Schmücker, U. und Esche, H. (2001): The histone acetyltransferase activity of PCAF cooperates with the brahma/SWI2-related protein BRG-1 in the activation of the enhancer A of the MHC class I promoter. *Gene* **17**: 111-120.

Lehmkuhler, O., Kühn, C., Esche, H. und Brockmann, D. (2002): A point mutation in the first splice donor leads to reduced oncogenic properties of the adenovirus serotype 12 E1A gene. *Zur Publikation eingereicht.*

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Oliver Lehmkuhler
Geburtsdatum	13.06.1969
Geburtsort	Dinslaken
Familienstand	ledig
Anschrift	Serlostr. 8, 45143 Essen

Schulausbildung

1975-1979	Otto-Willmann-Grundschule, Voerde
1979-1988	Gymnasium Voerde, Voerde
Juni 1988	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

09/1988-12/1990	Zivildienst, Seniorenzentrum Voerde
-----------------	-------------------------------------

Hochschulausbildung

10/1990-08/1992	Studium des Bauingenieurwesens, Ruhr-Universität Bochum
10/1992-10/1997	Studium der Biologie, Ruhr-Universität Bochum
11/1997	Mündliche Diplomprüfung
01/1998-01/1999	Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie, Universität Essen
12.02.1999	Abschluss: Diplom Biologe
seit März 1999	Wissenschaftlicher Angestellter und Promotion am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung), Universität Essen

Essen, den 06.02.2002

10. Erklärungen

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 7:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „**Funktion des Adenovirus Serotyp 12 E1A-Gens bei der malignen Transformation primärer Mauszellen**“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Oliver Lehmkuhler befürworte.

Essen, den _____
(Prof. Dr. H. Esche)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 6:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
(Oliver Lehmkuhler)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 8:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
(Oliver Lehmkuhler)

Danksagungen

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Esche für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Unterstützung bei fachlichen und organisatorischen Problemen.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Priv. Doz. Dr. D. Brockmann. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und die fachliche Unterstützung haben viel dazu beigetragen, dass diese Arbeit in der vorliegenden Form entstehen konnte.

Ganz lieber Dank gebührt allen ehemaligen und rezenten Laborkollegen, darunter Christiane, Christoph, Franziska, Kai, Katja und Rozita für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Zusammenarbeit. Silke danke ich besonders für das Korrekturlesen dieser Arbeit und Tina für die Hilfe bei den Histologischen Untersuchungen. Ebenfalls danken möchte ich allen Angehörigen des Instituts für Zellbiologie für die gute Kooperation. Besonderer Dank gilt Raif und Holger für die Hilfe bei den FACS-Analysen.

Ganz besonders danken möchte ich meinen ehemaligen Kollegen Alexandra und Peter mit denen ich viele Freuden aber auch reichlich Leid geteilt habe, die mich aber immer wieder zum Durchhalten angestachelt haben. Peter danke ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Den technischen Assistentinnen Frau Ulla Schmücker und Frau Claudine Kühn bin ich zu großem Dank für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Schmid und Frau Linker danke ich für die Kooperation und die fachliche Unterstützung.

Dank gilt auch den eifrigen Korrektur-Lesern Frau Karin Kirsch und Herrn Franz-Josef Spiekermann.

Meiner Familie gilt besonderer Dank für ihre immerwährende Unterstützung jeglicher Art.

Am meisten danken möchte ich meiner Lebensgefährtin Hiltrud, die durch ihre Liebe, ihre Unterstützung und das Ertragen meiner schlechten Laune viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.